



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



**CAROLINE GERALDI PIEROZZI**

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E TRANSMISSÃO DE FUNGOS EM  
SEMENTES DE OLERÍCOLAS**

**Botucatu**

**2017**



**CAROLINE GERALDI PIEROZZI**

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E TRANSMISSÃO DE FUNGOS EM  
SEMENTES DE OLERÍCOLAS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências  
Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu,  
para obtenção do título de Doutora em  
Agronomia - Proteção de Plantas

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Zanin Kronka

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Toshio  
Fujihara

**Botucatu**

**2017**

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

P624i Pierozzi, Caroline Geraldi, 1985-  
Identificação morfológica e transmissão de fungos em sementes de olerícolas / Caroline Geraldi Pierozzi. - Botucatu: [s.n.], 2017  
59 p.: il., color., grafs., tabs.

Tese(Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agrônomicas, Botucatu, 2017  
Orientador: Adriana Zanin Kronka  
Coorientador: Ricardo Toshio Fujihara  
Inclui bibliografia

1. Sementes - doenças e pragas. 2. Fungos - Identificação. 3. Fungos fitopatogênicos. I. Kronka, Adriana Zanin II. Fujihara, Ricardo Toshio. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônomicas. IV. Título.

Elaborada por Maria Lúcia Martins Frederico - CRB-8:5255

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: Identificação morfológica e transmissão de fungos em sementes de olerícolas

**AUTORA: CAROLINE GERALDI PIEROZZI**

**ORIENTADORA: ADRIANA ZANIN KRONKA**

**COORIENTADOR: RICARDO TOSHIO FUJIHARA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (PROTEÇÃO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ADRIANA ZANIN KRONKA  
Depto de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP

Prof. Dr. EDSON LUIZ FURTADO  
Departamento de Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP-Botucatu/SP

Dra. MARTHA MARIA PASSADOR  
Depto. Fitossanidade / Instituto Agronômico de Campinas

Prof. Dr. ANTONIO ISMAEL INÁCIO CARDOSO  
Departamento de Horticultura / UNESP / Botucatu/SP

Prof. Dr. JOSÉ OTÁVIO MACHADO MENTEN  
Departamento Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola / Esalq-USP

Botucatu, 01 de dezembro de 2017



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me guiar na escolha dos melhores caminhos.

À minha amada família, minha mãe Benedita, meu pai Marcos, minha irmã Aline e minha sobrinha Lívia, pelo apoio incondicional, compreensão nas horas mais difíceis e incentivo nos momentos de dúvida.

Ao meu namorado, Efrain, pelo companheirismo, compreensão, incentivo e encorajamento. Este apoio foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Aos meus queridos sogros, Aparecida e Wanderley, pelo apoio e carinho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Zanin Kronka, pela orientação durante todo o doutorado.

Ao Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara, pela orientação, apoio e paciência durante o desenvolvimento da tese.

Ao Prof. Dr. Gary Munkvold, pela orientação e por me receber tão bem nos EUA.

Ao Derrick, por todo ensinamento durante os seis meses de convivência nos EUA.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cecília Amaral e à Camila Fernanda da Silva (Dep. de Zoologia – UNICAMP), pela cessão e orientação no uso dos equipamentos para produzir as fotografias.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Sartori, pela orientação na análise estatística.

À Dr<sup>a</sup>. Christiane Ceriani do Instituto Biológico de São Paulo, por fornecer os isolados fúngicos utilizados no primeiro capítulo deste trabalho.

À FCA, por ser minha morada durante os últimos 12 anos de minha vida.

À Iowa State University, por me proporcionar uma experiência inesquecível.

A minha querida amiga Marília, pela parceria e incentivo.

A minha prima Maria Luisa, pelo apoio em todos os momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida para doutorado sanduíche nos Estados Unidos da América.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida.

Muito obrigada!

## RESUMO

A identificação morfológica e a transmissão de fungos são dois ramos importantes da Patologia de Sementes. As chaves interativas, que têm como base a morfologia fúngica, auxiliam a pesquisa e trabalhos técnicos, de forma que a identificação digital se torne mais presente. Por este método, desenvolveu-se uma chave interativa que auxilie a identificação de onze espécies fúngicas associadas às sementes de cebola, cenoura, pimentão e tomate. Esta baseou-se em uma matriz composta por seis caracteres: cultura, conídio, conidióforo, coloração do conidióforo longo, coloração do micélio e presença ou não de setas. O usuário seleciona respostas aos caracteres oferecidos no software e o microrganismo é corretamente indicado. A validação desta ferramenta foi realizada por meio de teste com grupos de voluntários compostos por alunos de graduação e pós-graduação. Analisou-se o tempo despendido por cada voluntário para analisar 25 sementes com fungos comuns aos da chave, como também a porcentagem de acerto e o grau de dificuldade de cada participante. Os resultados foram confrontados com um grupo controle, o qual utilizou o meio convencional (manuais impressos de identificação). A elevada porcentagem de acertos na diagnose com o auxílio da chave e a classificação de fácil uso pelos usuários confirmou a eficiência do método. Também observou-se um aumento da acurácia dos resultados quando comparado ao sistema convencional. Além disso, esta chave pode ser útil em vários setores, desde auxiliar no treinamento de iniciantes na Patologia de Sementes até em atividades acadêmicas. Já para o estudo da transmissão de fungos via sementes, foram necessários tanto os conhecimentos morfológicos quanto os moleculares. Neste sentido, avaliou-se a transmissão das três raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) por sementes de tomate. Foram utilizados dois isolados de cada raça e para cada um deles foram inoculadas 200 sementes em suspensão de esporos à concentração de  $10^7$  esporos/mL. Estas sementes foram semeadas em bandejas com células e mantidas sob condições controladas até completarem três semanas após a emergência. Foram avaliadas 100 plântulas por isolado quanto a massa, comprimento de raízes e severidade. Além disso, pequenos fragmentos da parte aérea e raiz, de cada plântula, foram plaqueados em meio de cultura para posterior análise molecular e confirmação da transmissão. Analisou-se também a eficiência do tratamento de sementes de tomate com ácido clorídrico (HA) e fosfato trissódico (TSP) no controle de FOL. Para isso, foram utilizados três lotes de sementes, cada um deles inoculado com uma raça diferente

de FOL e tratados com os diferentes tratamentos. Os resultados demonstraram baixa taxa de transmissão para as raças 1 e 3 e nula para a raça 2. Em relação aos resultados de massa das plântulas e comprimento de raízes, notou-se que o baixo desenvolvimento de plântulas é inversamente proporcional a elevada transmissão. Além disso, a doença apresenta-se de forma assintomática em plântulas. Ao analisar os resultados dos tratamentos de sementes, constatou-se que o ácido clorídrico foi 100% eficiente no controle de FOL, enquanto que o fosfato trissódico não controlou as raças de FOL.

**Palavras-chave:** Patologia de sementes. Chave de identificação. Fungos fitopatogênicos.

## ABSTRACT

Morphological identification and fungi transmission are two important Seed Pathology branches. Interactive keys, based on fungal morphology, help research and technical work, so that digital identification becomes more present. Through this method, an interactive key was developed to help identify eleven fungal species associated with carrot, onion, pepper and tomato. It was based on a matrix composed by six characters: crop, conidium, conidiophore, long conidiophore coloration, mycelial staining and presence of setae. The user selects responses to the features offered in the software and the micro-organism is correctly indicated. The validation was performed through volunteers groups composed of undergraduate and graduate students. It was analysed the time spend by each volunteer to examine 25 seeds with fungi common to the key, as well as the percentage of hits and the difficulty level of each participant. The results were compared with a control group, which used the conventional means (printed identification manuals). The high percentage of correct answers in the diagnosis with the key use and the user easy classification confirmed its efficiency. There was also an increase in the results accuracy when compared to the conventional system. In addition, this key can be useful in many sectors, from assisting in training beginners in seed pathology to academic activities. For the study of fungi transmission through seeds, both morphological and molecular knowledge were necessary, which made the result safer. In this sense, the three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* transmission by tomato seeds were analyzed. Two isolates of each race were used and 200 seeds were inoculated in spore suspension at  $10^7$  spores/mL concentration. These inoculated seeds were planted in trays with individual cells and kept under controlled light and humidity conditions until completed three weeks after emergence. The evaluation consisted in weight, root length and severity from 100 seedlings. In addition, small parts of the shoot and root of each seedling were plated in medium culture for further molecular analysis and confirmation of the transmission. The efficiency of tomato seed treatment with hydrochloric acid (HA) and trisodium phosphate (TSP) in FOL control was also analyzed. For this, three seed lots were used, each one inoculated with a different race of FOL and treated with the different treatments. The results showed a low transmission rate for races 1 and 3 and null for race 2. Regarding the results of seedling mass and the root length, it was observed that the low seedling development is inversely proportional to high transmission. In addition, the disease presents asymptotically in seedlings. When

analyzing the seed treatments results, it was verified that hydrochloric acid was 100% efficient in the FOL control, whereas trisodium phosphate did not control the FOL race.

**Keywords:** Seed Pathology. Identification key. Phytopathogenic fungi.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO DE UMA CHAVE INTERATIVA (LUCID) PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES DE OLERÍCOLAS.....</b>	<b>16</b>
1.1 INTRODUÇÃO.....	19
1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
1.2.1 ISOLADOS FÚNGICOS E SEMENTES SELECIONADAS.....	20
1.2.2 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES.....	21
1.2.3 TESTE DE SANIDADE E OBTENÇÃO DAS FOTOGRAFIAS.....	21
1.2.4 LUCID KEY.....	22
1.2.5 VALIDAÇÃO DA CHAVE.....	24
1.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
1.3 RESULTADOS.....	24
1.3.1 LUCID PLAYER.....	24
1.3.2 VALIDAÇÃO.....	27
1.4 DISCUSSÃO.....	30
REFERÊNCIAS.....	32
<b>CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA TRANSMISSÃO DAS RAÇAS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> ATRAVÉS DE SEMENTES DE TOMATE.....</b>	<b>35</b>
2.1 INTRODUÇÃO.....	38
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.2.1 DETERMINAÇÃO DAS RAÇAS.....	39
2.2.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	40

2.2.3 ANÁLISES DE PCR.....	41
2.2.4 ISOLADOS FÚNGICOS USADOS NO ESTUDO DE TRANSMISSÃO.....	42
2.2.5 INOCULAÇÃO DAS SEMENTES.....	42
2.2.6 ENSAIO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO.....	43
2.2.7 TRATAMENTO DE SEMENTES.....	44
2.2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
2.3 RESULTADOS.....	44
2.3.1 DETERMINAÇÃO DAS RAÇAS.....	44
2.3.2 ENSAIO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO.....	46
2.3.3 TRATAMENTO DE SEMENTES.....	48
2.4 DISCUSSÃO.....	49
2.4.1 ENSAIO EM CÂMARA DE CRESCIMENTO.....	49
2.4.2 TRATAMENTO DE SEMENTES.....	50
REFERÊNCIAS.....	53
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>58</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A propagação sexual é o principal meio de disseminação de plantas na agricultura, responsável pelo fomento de 90% da produção de alimentos vegetais da dieta humana ao redor do mundo (MAUDE, 1996; DHINGRA, 2005; CARVALHO; NAKAGAWA, 2012). Paralelamente, sementes frequentemente estão associadas à veiculação de microrganismos, incluindo os indesejáveis fitopatogênicos e também os considerados contaminantes (DHINGRA, 2005). Neste sentido, a preocupação com a produção e o uso de sementes livres de patógenos constitui uma das premissas básicas nas boas práticas agrícolas.

Entretanto, segundo a Lei Nº 10.711/2003, que visa garantir a identidade e qualidade do material de multiplicação e de reprodução vegetal produzido, comercializado e utilizado em todo território nacional, não é obrigatoriedade dos órgãos certificadores realizar a análise fitossanitária nos lotes de sementes comercializadas no Brasil, sendo exigida apenas as seguintes descrições na embalagem: nome da espécie, lote, pureza, germinação, safra, validade do teste de germinação e peso. Esta não exigência de testes fitossanitários revela uma legislação incompleta e deficiente, visto que estes testes são essenciais para a comercialização de sementes isentas de agentes fitopatogênicos.

Dentre os microrganismos que habitam as sementes, os fungos são os maiores causadores de danos, tanto pela quantidade de espécies incidentes, quanto pela facilidade de disseminação quando associados às sementes, prolongando sua sobrevivência e viabilidade nessas estruturas (DHINGRA, 2005). Como exemplos, tem-se as espécies do gênero *Fusarium*, que habitam o solo e ocasionam problemas sanitários em diversos hospedeiros (PEREIRA, 2015), como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), agente causal da murcha de fusarium em tomateiro que pode refletir em até 100% de perdas na produção (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Os principais sintomas da murcha de fusarium em tomate são coloração amarela intensa das folhas mais velhas e coloração parda dos vasos condutores das folhas e caule. Além disso os frutos não se desenvolvem corretamente, levando à queda prematura dos mesmos (KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Foram descritas três raças fisiológicas desse patógeno disseminadas pelo mundo, principalmente as raças 1 e 2 (TOKESHI; GALLI 1966; STRAVATO et al., 1999). Já a raça 3, ainda restringe-se a poucos países, como Austrália, Estados Unidos, México, Reino Unido, Nova Zelândia, Chile, África do Sul, Coréia e Brasil (GRATTIDGE;

O'BRIEN 1982; VOLIN; JONES 1982; VALENZUELA-URETA et al., 1996; REIS et al., 2005; CHOI et al., 2013; JACOBS et al., 2013; SEPÚLVEDA-CHAVERA et al., 2014), onde foi introduzida via sementes importadas de tomate infectadas, comprovando o elevado risco e eficiência de disseminação de FOL por essas estruturas (REIS et al., 2005).

O manejo desta doença, geralmente, é limitado e difícil, sendo o emprego de genótipos resistentes a medida mais eficiente e praticada (KUROZAWA; PAVAN, 2005). Todavia, estes materiais, muitas vezes, não possuem características agrônomicas adequadas ao mercado (LARA, 1991), induzindo assim, uma corrida entre empresas de melhoramento no desenvolvimento de novos genótipos com dupla aptidão. Outro fator limitante no emprego da resistência frente aos patógenos é a possibilidade de surgimento de novas raças virulentas, com habilidades de superar os mecanismos de resistência do hospedeiro através da coevolução (ELIAS et al., 1993; MARLATT et al., 1996). Por estes fatores, alguns produtores preferem arriscar suas lavouras escolhendo cultivares de tomate suscetíveis, porém, altamente produtivas e desejadas pelo mercado consumidor.

Dentro da Patologia de Sementes, além dos problemas envolvendo a transmissão de patógenos também existem adversidades em torno da identificação destes microrganismos, principalmente tratando-se de fungos, pois, atualmente, os materiais disponíveis ao meio científico que auxiliam essa identificação encontram-se desatualizados e muitas vezes são de baixa qualidade.

As análises de fungos em sementes são realizadas por: (i) inspeção visual de sementes; (ii) incubação em substrato de papel ("blotter test"); e (iii) plaqueamento em meio Agar sólido (LUCCA FILHO, 1987; BRASIL, 2009). Para a obtenção de resultados mais aceitáveis e confiáveis, faz-se necessário o desenvolvimento de inovações tecnológicas que auxiliem e facilitem estas análises, minimizando os erros de leitura.

As chaves interativas de taxonomia são ferramentas úteis que vêm ganhando espaço no setor da classificação, detecção e diagnose de doença de plantas (BOUKET et al., 2015; MARIN-FELIX et al., 2017). Chaves como estas consistem na integração de imagens e descrições, possibilitando que o usuário realize a identificação facilmente, de forma dinâmica e confiável.

Diante dos fatos apresentados, os objetivos gerais desta tese foram: a) desenvolver uma chave interativa que auxilie a identificação dos principais fungos

associados às sementes das principais olerícolas; b) descobrir as taxas de transmissão das três raças de FOL via sementes de tomate e; c) estudar a eficiência do tratamento de sementes com Ácido clorídrico (HA) e Fosfato trissódico (TPS) no controle de FOL em sementes de tomate.

A tese foi dividida em dois capítulos. O primeiro refere-se ao desenvolvimento de uma chave interativa com a finalidade de auxiliar a identificação de fungos associados às sementes das principais olerícolas, intitulado “Desenvolvimento de uma chave interativa (Lucid) para a identificação de fungos em sementes de olerícolas”; o segundo intitulado “Estudo da transmissão das raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de sementes de tomate”, o qual visou estudar a transmissibilidade das raças de FOL.

## **CAPÍTULO 1 - DESENVOLVIMENTO DE UMA CHAVE INTERATIVA (LUCID) PARA A IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS EM SEMENTES DE OLERÍCOLAS**

Caroline Geraldi Pierozzi, Ricardo Toshio Fujihara, Efrain Santana Souza, Marília Pizetta, Maria Márcia Sartori, Adriana Zanin Kronka

**Resumo:** Chaves interativas auxiliam a pesquisa e trabalhos técnicos, de forma que a identificação digital se torne cada vez mais presente no meio científico e acadêmico. Por este método, foi desenvolvida uma chave interativa que auxilia na identificação de onze espécies fúngicas associadas às sementes de cebola, cenoura, pimentão e tomate. Esta chave foi baseada em uma matriz composta por seis caracteres: cultura, conídio, conidióforo, coloração do conidióforo longo, coloração do micélio e presença de setas, e seus respectivos estados. O usuário seleciona respostas aos caracteres oferecidos pelo software Lucid Player 3.3 e o microrganismo é corretamente indicado, juntamente com uma folha adicional contendo informações intrínsecas à espécie. A validação da chave interativa foi realizada por grupos distintos de voluntários: (i) acadêmicos de Pós-graduação com conhecimento prévio e utilizando a chave interativa; (ii) alunos de graduação com pouco conhecimento prévio e com acesso à chave; e (iii) alunos de graduação com pouco conhecimento prévio e utilizando sistema convencional de identificação como os manuais impressos utilizados em laboratórios de patologia de sementes. Analisou-se o tempo despendido por cada voluntário para análise de 25 sementes infectadas com as espécies fúngicas da chave, como também, a porcentagem de acerto e o grau de dificuldade de cada participante. A elevada porcentagem de acertos na diagnose com o uso da chave interativa e a classificação de fácil uso pelos usuários confirmaram sua eficiência, pois houve um aumento da acurácia e na precisão dos resultados quando comparado ao sistema convencional. Além disso, a porcentagem de acertos e o grau de dificuldade apresentou baixa variabilidade dentro dos grupos (i) e (ii), demonstrando que o uso dessa ferramenta pode uniformizar os resultados de identificação. Esses resultados são consequência da interação do usuário com definições, ilustrações e fotografias que detêm informações precisas e de alta resolução, reproduzindo fielmente as características fúngicas observadas nas sementes por meio de estereoscópios.

Visando auxiliar no ensino, pesquisa institucional e comercial, fiscalização e certificação de sementes, tornando as diagnoses mais seguras e precisas. A chave encontra-se disponível gratuitamente no endereço <http://www.cvi.ufscar.br/chaves.html>.

**Palavras-chave:** Chave de identificação. Sanidade de sementes. Olerícolas.

**Abstract:** Interactive keys help research and technical work, so that digital identification becomes present in the scientific and academic environment. By this method, an interactive key was developed that assists the identification of eleven fungal species associated with onion, carrot, pepper and tomato seeds. This key was based on a matrix composed by six characters: culture, conidium, conidiophore, long conidiophore color, mycelial color and presence of setae. The user selects answers to the characters offered in the software Lucid Player 3.3 and the microorganism is correctly indicated, along with an additional sheet containing intrinsic information to the species. The interactive key validation was performed through distinct groups of volunteers: (i) graduate students with prior knowledge and using the interactive key; (ii) undergraduate students with little prior knowledge and access to key; and (iii) undergraduate students with little prior knowledge and using conventional identification system such as the printed manuals used in seed pathology laboratories. The time spent by each volunteer was analyzed to examine 25 seeds with common fungi to the key, as well as the correct answer percentage and the difficulty degree of each participant. The high correct answers percentage in the diagnosis with the interactive key use and the easy user classification confirmed the efficiency, since there was an increase in the accuracy and results precision when compared to the conventional system. In addition, the percentage of correct answers and the difficulty degree presented low variability within groups (i) and (ii), demonstrating that the use of this method can standardize the identification results. These results are a consequence of the user interaction with definitions, illustrations and photographs that hold accurate and high resolution information, faithfully reproducing the fungal characteristics observed in the seeds through stereoscopes. Aiming to assist in teaching, institutional and commercial research, inspection and seeds certification, making the diagnoses safer and more accurate. The key is available for free at <http://www.cvi.ufscar.br/chaves.html>.

**Keywords:** Identification key. Seed health. Vegetables.

## 1.1 INTRODUÇÃO

As sementes são o principal meio de propagação da maioria das culturas cultiváveis (MAUDE, 1996; CARVALHO; NAKAGAWA 2012), dentre as quais cebola, cenoura, pimentão e tomate. Por outro lado, também são eficientes disseminadoras de microrganismos fitopatogênicos que podem ocasionar perdas na produção (BAKER, 1972; DHINGRA, 2005). Diante deste problema, o uso de sementes sadias é premissa básica das boas práticas agrícolas.

A associação biológica entre sementes e fungos é ainda mais preocupante quando se trata de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, como os do gênero *Fusarium*, que sobrevive e dissemina-se via sementes para áreas cultiváveis antes não infestadas. Fungos desse tipo podem sobreviver no solo por diversos anos, limitando a exploração agrícola (KIMATI et al., 2005).

Como resposta a esta problemática, a Patologia de Sementes, um ramo da Fitopatologia, tem atuado na identificação de patógenos associados às mesmas, desenvolvendo metodologias desde 1923 (AGARWAL; SINCLAIR, 1996). Desde então, a detecção de fungos em sementes vem ganhando força e importância na pesquisa e na certificação de sementes em todo mundo (SCHAAD et al., 2014).

Tradicionalmente, a identificação de fungos em sementes se dá por métodos como *Blotter test* e *plaqueamento em meio de cultura* (BRASIL, 2009; ISTA, 2017), baseadas nas características morfológicas do patógeno. Tais testes, frequentemente, são uma tarefa difícil para leigos ou iniciantes na área de Patologia de Sementes, exigindo conhecimento prévio sobre as características morfológicas fúngicas para a correta diagnose em termos de espécie.

Os guias ou catálogos de identificação ilustrados para fungos em sementes são escassos (WATANABE, 2002; BRASIL, 2009) ou obsoletos e, em alguns casos, apresentam ilustrações, figuras e/ou fotografias de baixa qualidade. Embora sejam tradicionalmente impressos, os avanços da informática e tecnologia “hand-held” permitiram o desenvolvimento das chaves de identificação interativas ou de múltiplo acesso (FARR, 2006; LEGGETT; KIRCHOFF, 2011; BOUKET et al., 2015; MARIN-FELIX et al., 2017). Além disso, poucas também são as chaves interativas desenvolvidas para a identificação de fungos em sementes (ALVES, 2006).

O presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma chave de identificação interativa de fácil uso através do software Lucid 3.3<sup>®</sup> para a identificação de espécies fúngicas associadas às sementes de cebola, cenoura, pimentão e tomate.

Esta ferramenta visa auxiliar pesquisadores, professores e toda comunidade reguladora que trabalha para mitigar doenças fúngicas transmitidas via sementes, melhorando a acurácia e confiabilidade dos testes de sanidade de sementes.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Isolados fúngicos e sementes selecionadas

Os isolados fúngicos foram adquiridos da micoteca do Instituto Biológico de São Paulo, SP, e as sementes de cebola, cenoura, pimentão e tomate livres de tratamento químico comercial adquiridas da empresa ISLA®.

**Tabela 1** - Culturas e respectivas espécies fúngicas utilizadas na chave interativa.

Cultura	Isolados fúngicos
Cebola	<i>Aspergillus flavus</i> (Link) <i>A. niger</i> (Tiegh) <i>Cladosporium</i> spp. (Link) <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>cepae</i> (Penz) Penz & Sacc <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cepae</i> (Hanzawa) W.C. Snyder & H.N. Hansen
Cenoura	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl <i>Alternaria dauci</i> (J.G. Kuhn) Groves & Skolko <i>Cladosporium</i> spp. <i>F. oxysporum</i> (Schltdl)
Pimentão	<i>Alternaria solani</i> (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout <i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>Cladosporium</i> spp. <i>C. gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.
Tomate	<i>A. solani</i> <i>A. flavus</i> <i>Cladosporium</i> spp. <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hans

A maioria destes fungos acomete os cultivos de cebola, cenoura, pimentão e tomate (KUROZAWA; PAVAN, 2005), que se destacam em produção e comercialização no Brasil entre as demais hortaliças (AGRIANUAL, 2015).

### 1.2.2 Inoculação das sementes

Inicialmente, os isolados fúngicos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, permanecendo incubados por sete dias em câmara do tipo BOD a 22°C e fotoperíodo de 12 horas, de acordo com Lucca Filho (1987) e Brasil (2009).

Discos de meio de cultura de 0,5 cm de diâmetro com crescimento fúngico foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido de manitol (BDA + manitol), com potencial hídrico ajustado para -1,0 MPa (BDA acrescido de 73,77g de manitol; água estéril 1000 mL). A concentração do soluto (manitol) foi obtida pela fórmula de Van't Hoff (SALISBURY; ROSS, 1991):  $P_o = -iCRT$ , onde:  $P_o$  = Potencial osmótico (MPa);  $i$  = Constante de ionização;  $R$  = Constante geral de gases ( $0,00831 \times \text{Kg} \times \text{MPa} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1}$ );  $T$  = Temperatura absoluta ( $T \text{ } ^\circ\text{C} + 273$ );  $C$  = Concentração (moles  $\text{Kg}^{-1}$  de água). O potencial hídrico foi ajustado para -1,0 MPa, pois proporciona maiores índices de infecção em sementes sem inviabilizá-las para usos posteriores (Machado et al. 2001a; Machado et al. 2001b; Machado et al. 2004).

Antes da inoculação, as sementes foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2 % durante um minuto, lavadas com água estéril e secas sobre folhas de papel de filtro esterilizadas em condição ambiente, durante 24 horas. Em seguida, foram distribuídas em camada única sobre o inóculo cultivado no meio osmoticamente modificado (BDA + manitol), mantendo-as em contato com o patógeno por 24 horas. Finalmente, as sementes foram novamente desinfestadas como descrito anteriormente.

### 1.2.3 Teste de sanidade e obtenção das fotografias

Para a obtenção das estruturas fúngicas nas sementes, foram realizados testes de sanidade através da incubação em papel de filtro, segundo o *International Seed Testing Association* (ISTA, 2017). Distribuíram-se de forma equidistante, 25 sementes por placa de Petri forradas com três folhas de papel de filtro previamente umedecidas em água destilada esterilizada. Posteriormente, as sementes foram incubadas à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e sob regime luminoso de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, por sete dias.

Com o auxílio de um microscópio estereoscópio, as sementes foram examinadas individualmente, sendo selecionadas para a captura de imagens aquelas contendo corpos de frutificação bem definidos.

As imagens foram obtidas no Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, por meio de um estereoscópio com câmera digital acoplada (Zeiss® - Axio Zoom.V16 com câmera AxioCam MRc) e software exclusivo do equipamento. Estruturas importantes, como esporos e hifas, que não puderam ser obtidas pelo estereoscópio, foram capturadas com um microscópio de luz (Zeiss® - Axio Imager M2).

#### 1.2.4 Lucid Key

O software Lucid (LucidCentral.org, Queensland, Australia) é uma ferramenta versátil para auxiliar na identificação e produção de diagnoses (STEHMANN et al., 2017). Atualmente, as chaves de identificação interativas desenvolvidas possuem um amplo público alvo, desde alunos do ensino médio e universitário até taxonomistas.

O Lucid Key é composto por dois diretórios: *Builder*, que armazena os dados referentes às “entities” (espécies fúngicas) e aos “features” (caracteres e estados de caracteres), e *Player* que constrói a chave propriamente dita.

O *Builder* foi utilizado para desenvolver o suporte principal da chave. Um conjunto de seis caracteres e 21 estados de caractere (Tabela 2) foram selecionados com base em características fúngicas visíveis ao microscópio óptico (HAMLIN, 1998; BARNETT; HUNTER, 1999; BRASIL, 2009) e marcados por meio de uma matriz, onde os caracteres e seus respectivos estados foram interligados às espécies fúngicas (Figura 1).

**Tabela 2 - Caracteres e estados de caractere utilizados na chave interativa.**

Caracteres	Estados de caracteres
Cultura	Cebola Cenoura Pimentão Tomate
Conídio	Em cadeia Individual Não visível
Conidióforo	Curto Longo Curto (não visível)
Cor do conidióforo longo	Pigmentado (preto) Hialino (transparente)
Cor do micélio	Marrom Cinza Branco Rosa Preto Verde Amarelo
Presença de setas	Presente Ausente

**Figura 1 - Matriz usada para interligar os estados de caracteres com as espécies fúngicas presentes no Lucid Builder.**

Lucid3 Builder - Interactive key to fungal identification on seeds

File Edit View Search Window Help

Add Entry

	Alternaria altern...	Alternaria dauci	Alternaria solani	Aspergillus flavus	Aspergillus niger	Cladosporium s...	Colletotrichum g...	Colletotrichum g...	Fusarium oxysp...	Fusarium oxysp...
Crop										
Onion										
Carrot										
Pepper										
Tomato										
Conidia										
Branched chains										
Single										
Not visible										
Conidiophore										
Short										
Long										
Short (not visible)										
Color of long conidiophore										
Dark (Black)										
Hyaline (Transparent)										
Color of mycelium										
Brown										
Grey										
White										
Roseate (Salmon)										
Black										
Green										
Yellow										
Presence of setae										

Feature name: Conidia  
Entity name: Fusarium oxysporum f. sp. cepae

Tree View Spreadsheet Scoring Score Analyser

### 1.2.5 Validação da chave

Para fins de validação e eficiência da chave interativa foi realizado um teste de sanidade de sementes e analisado por meio da porcentagem de acertos, tempo gasto e grau de dificuldade dos usuários. Para tanto, foram utilizadas sementes, sadias e sem tratamento, de cenoura e pimentão adquiridas da empresa ISLA®. Para cada cultura foram preparadas amostras com 25 sementes associadas às espécies fúngicas, seguindo o protocolo do *Blotter test* (BRASIL, 2009; ISTA, 2017).

Foram utilizados três grupos de avaliadores voluntários (n=30), oriundos da FCA/UNESP, Botucatu, SP, e classificados em função do conhecimento prévio sobre patologia de sementes: (i) acadêmicos de Pós-graduação em Proteção de Plantas e Ciência Florestal, com conhecimento prévio e utilizando a chave interativa; (ii) alunos de graduação do curso de Engenharia Agrônômica, com pouco ou nenhum conhecimento prévio e com acesso à chave interativa; (iii) alunos de graduação com pouco conhecimento prévio, porém utilizando materiais convencionais existentes na literatura (BARNETT; HUNTER, 1999; BRASIL, 2009) para a identificação.

Cada avaliador teve acesso a uma placa de Petri contendo 25 sementes, um microscópio estereoscópio, um computador com a chave interativa ou o material convencional. Sobre as respostas dos voluntários foi analisada a porcentagem de acerto; o tempo gasto para analisar uma placa (25 sementes); e o grau de dificuldade, classificado em: 1,0 – Muito fácil, 2,0 – Fácil, 3,0 – Difícil e 4,0- Muito difícil.

### 1.2.6 Análise estatística

Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ranks para comparar os grupos resposta. Considerou-se significativo quando  $p < 0,05$ . O software utilizado foi o Minitab 16 Statical Software (2010). Os dados foram representados em boxplot para possibilitar a avaliação da variabilidade dos grupos.

## 1.3 RESULTADOS

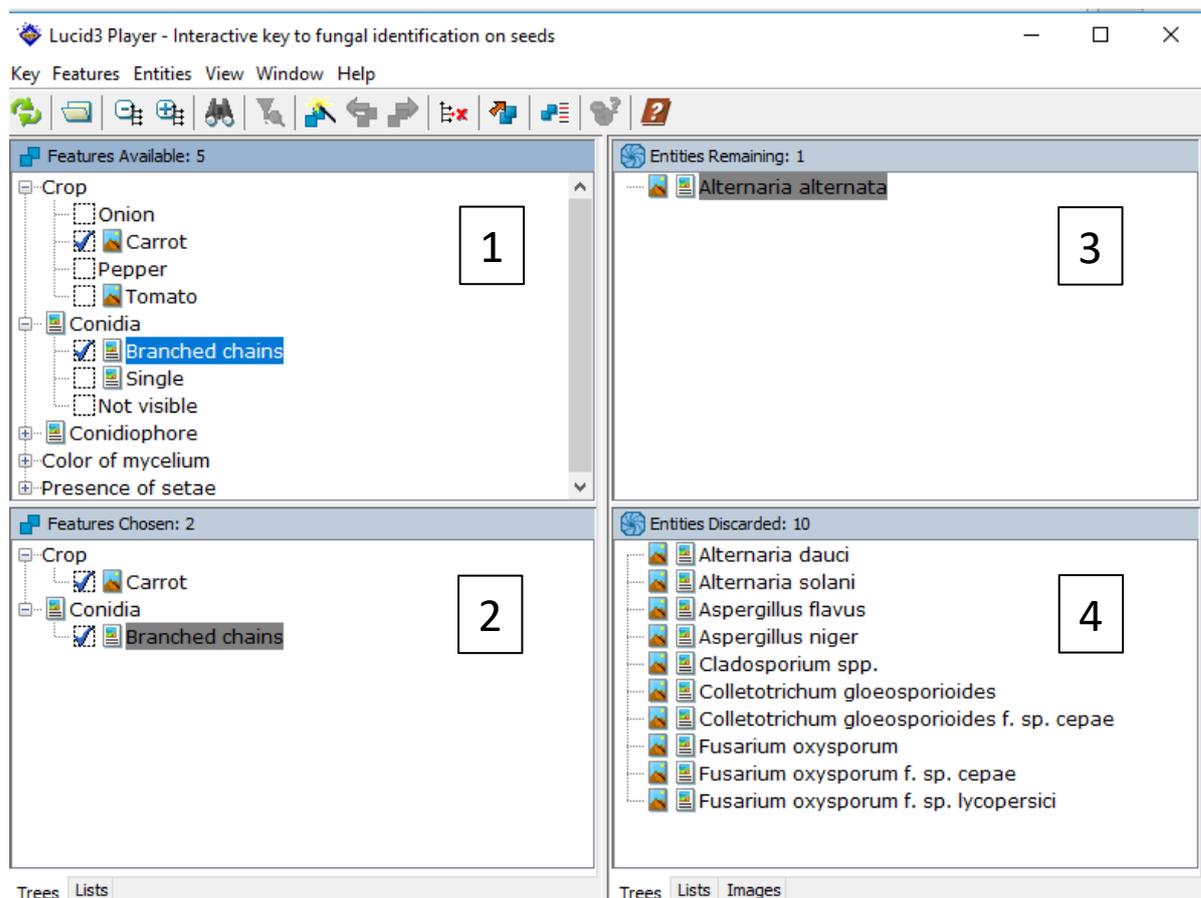
### 1.3.1 Lucid Player

A *Chave interativa para a identificação de fungos em sementes de olerícolas* (Lucid v 3.3) desenvolvida no presente estudo foi composta por uma matriz baseada na compilação de importantes caracteres morfológicos (BARNETT; HUNTER, 1999) para a identificação das 11 espécies fúngicas contidas na chave.

O usuário foi capaz de identificar as espécies fúngicas por meio da chave desenvolvida através do software Lucid Player, para isso foi necessário ter em mãos um teste finalizado de sanidade de sementes, do tipo *Blotter test*, com as frutificações fúngicas presentes na superfície das mesmas e o auxílio de um microscópio estereoscópio para a observação dessas estruturas.

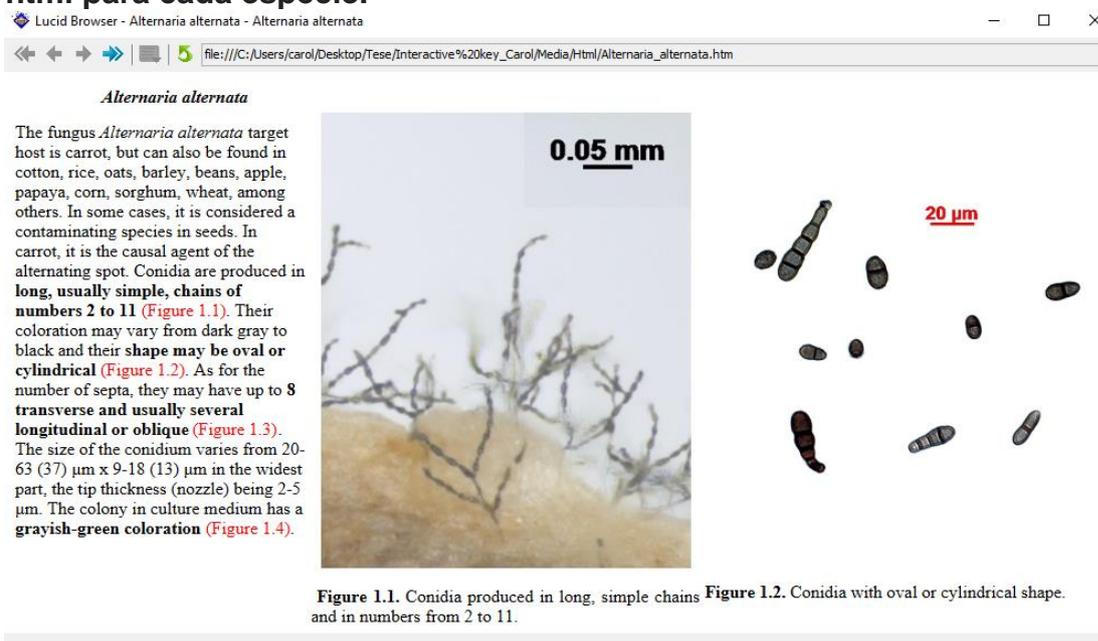
Quando a chave foi aberta, foram apresentadas quatro janelas: a superior esquerda que continha os caracteres e seus respectivos estados, sendo que os estados puderam ser visualizados clicando no símbolo (+). Além disso, descrições, ilustrações e fotografias dos caracteres e estados puderam ser observadas clicando nos ícones ao lado de cada um deles. Os caracteres puderam ser minimizados clicando no símbolo (-). Na janela inferior esquerda, foram exibidas as características selecionadas, e a inferior direita, as espécies fúngicas descartadas. O resultado final, com apenas um fungo, foi apresentado na janela superior direita (Figura 2). Para uma correta identificação não foi necessário a inserção de todos os estados de caracteres.

**Figura 2 - Chave interativa desenvolvida pelo software Lucid (v3.3). 1) caracteres e seus respectivos estados de caráter; 2) caracteres e estados de caráter selecionados; 3) espécies que apresentam os estados de caráter selecionados; e 4) espécies fúngicas descartadas.**

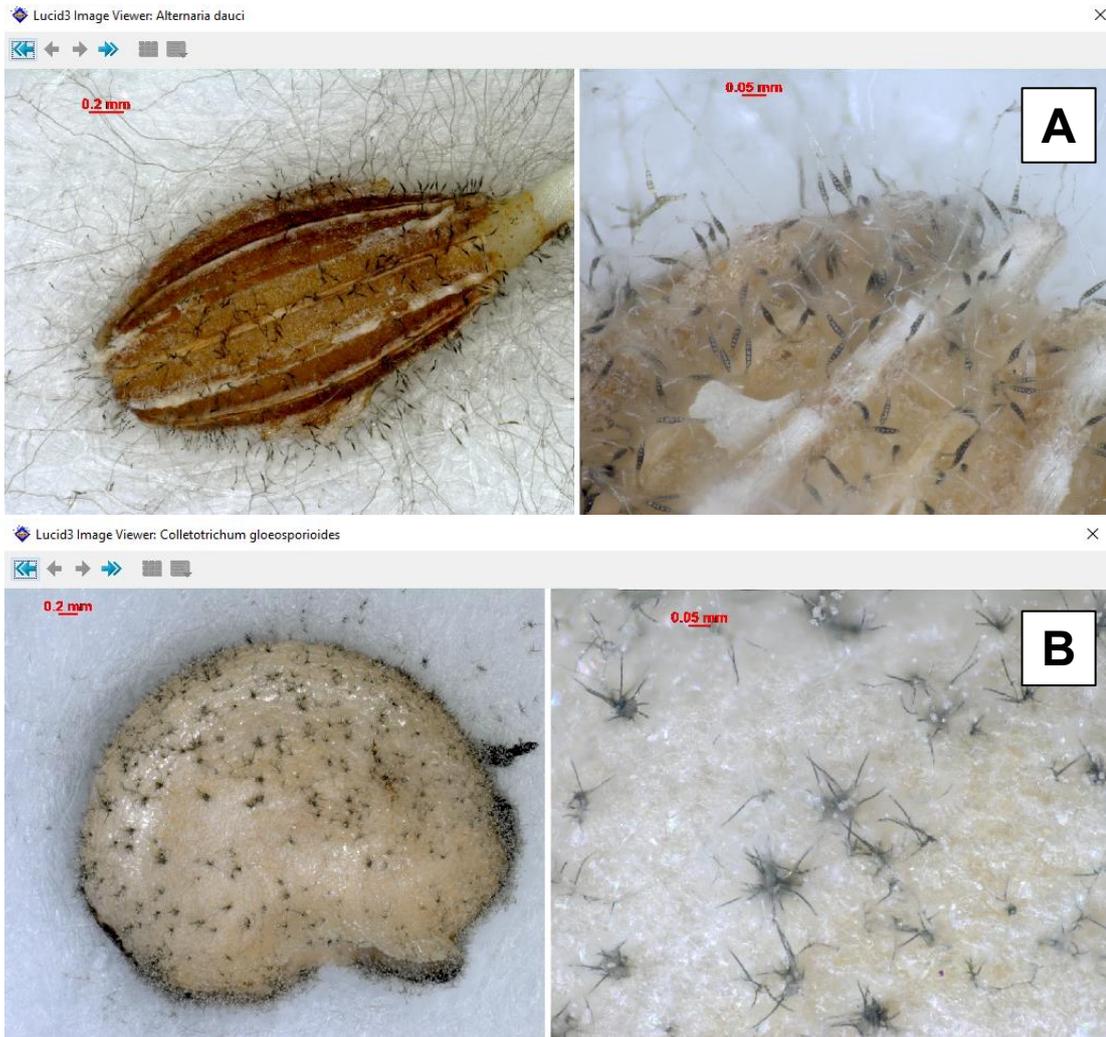


Após identificada a espécie, o usuário ainda teve acesso a uma folha informativa contendo uma página de descrição de espécies em html (Figura 3) e uma prancha com imagens específicas para cada espécie (Figura 4). A folha informativa foi representada pelo ícone logo ao lado do nome de cada espécie, podendo encontrar informações adicionais, como tipo e as dimensões dos esporos, coloração da colônia em cultivo artificial (meio de cultura) e demais hospedeiros.

### Figura 3 - Exemplo de folha informativa contendo a descrição de espécies em html para cada espécie.



**Figura 4 – Pranchas com imagens específicas de cada fungo. A: *Alternaria dauci* em cenoura; B: *Colletotrichum gloeosporioides* em pimentão.**



### 1.3.2 Validação

Ao analisar a porcentagem de acertos, verifica-se que o grupo (i) atingiu 82,38% de acertos, enquanto o grupo (ii) obteve um acerto médio de 84,71% nos testes avaliados (Tabela 3). Em contrapartida, o grupo (iii) obteve uma média inferior, com apenas 58,62%. Como esperado, diferenças significativas foram detectadas neste critério ( $p < 0,01$ ). Entretanto, ao analisar o tempo gasto por cada avaliador, verifica-se que não houve diferença significativa entre grupos (Tabela 3). Em relação ao grau de dificuldade no uso da chave interativa, observa-se que os grupos (i) e (ii) consideraram o sistema de fácil utilização, já o grupo (iii) apresentou maiores dificuldades, classificando a mesma como difícil, diferindo estatisticamente dos demais (Tabela 3).

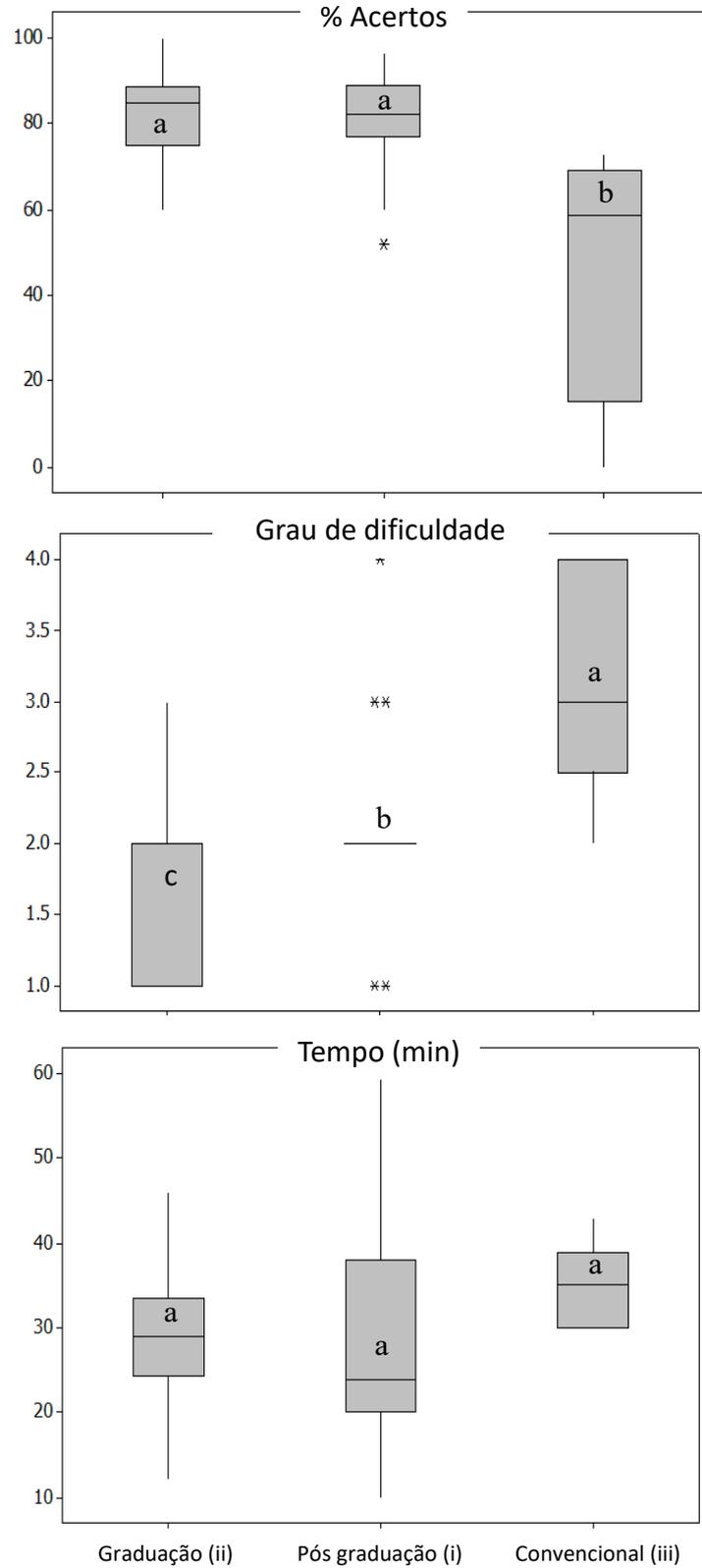
**Tabela 3 - Porcentagem média de acertos e erros, tempo médio gasto no uso da chave e o grau de dificuldade para cada grupo.**

Grupos	% Acertos	Média	% Erros	Média	Tempo (min)	Média	Grau de dificuldade*	Média
Pós-graduação (i)	82,38 a	80,38	17,62 b	19,08	25 a	28,97	2,0 b	2,05
Graduação (ii)	84,71 a	82,35	15,29 b	17,64	29 a	28,33	2,0 c	1,66
Convencional (iii)	58,62 b	45,55	41,38 a	54,45	35 a	34,60	3,0 a	3,20
P	0,005		0,005		0,195		0,0001	

\*Grau de dificuldade: 1,0 – Muito fácil; 2,0 – Fácil; 3,0 – Difícil e 4,0- Muito difícil a, b, c – nas colunas, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Kruskal-Wallis ranks com p a 5%.

Pode-se observar que o grupo (iii) apresentou maior variabilidade, tanto em relação à porcentagem de acertos, quanto em relação ao grau de dificuldade, comprovando assim que a avaliação obteve resultados distintos dependentes do avaliador e não de seu conhecimento específico. Já a porcentagem de acertos e o grau de dificuldade pouco variou dentro dos grupos (i) e (ii), certificando que o uso de uma chave interativa pode uniformizar os resultados de identificação de fungos em testes de sanidade de sementes (Figura 5).

**Figura 5 – Variação da porcentagem de acertos; tempo gasto e o grau de dificuldade dentro dos diferentes grupos avaliados na validação da chave interativa.**



## 1.4 DISCUSSÃO

Chaves para a identificação de patógenos são ferramentas extremamente úteis e, quando existentes, devem estar amplamente disponíveis para os envolvidos na cadeia agrícola, como pesquisadores, estudantes, empresas e produtores. No entanto, o uso de chaves de identificação não é uma prática tão comum em Fitopatologia como em outras áreas, como por exemplo, na Entomologia (COSTA LIMA, 1953; JONES et al., 1990; GALLO et al., 2002; FUJIHARA et al., 2011).

No sentido de otimizar o processo de diagnose de doenças em plantas, algumas ferramentas como chaves interativas e convencionais, além de bancos de dados fúngicos foram desenvolvidos (PITT, 1990; THRANE, 1990; BRIDGE et al., 1992; BOYD; SUN, 1994; YIALOURIS; SIDERIDIS, 1996; YIALOURIS et al., 1997; POZZA et al., 1999; ABU-NASER et al., 2008; BEGUM et al., 2012; RISTAINO, 2012; BOUKET et al., 2015), entretanto, são raros para fins de identificação de patógenos associados às sementes, ou até mesmo, inexistentes, principalmente quando se trata de imagens fúngicas de alta resolução e com detalhes das estruturas. Um dos raros trabalhos foi publicado por Alves et al. (2006), que desenvolveram o sistema “*Doctor Seed Fungi*”, destinado à identificação de fungos em sementes das grandes culturas. No entanto, este sistema não se encontra disponível.

Guias impressos para a identificação de fungos em sementes também já foram propostos (AHMED; REDDY 1993; NAVI et al., 1999; WATANABE, 2002; BRASIL, 2009), os quais compilam os principais fungos fitopatogênicos de alguns cultivos. Todavia, grande parte das imagens não possui boa definição de cores e estruturas fúngicas, o que compromete a comparação das características observadas na semente ao microscópio estereoscópio com as impressas na chave, acarretando em identificações duvidosas e/ou errôneas. Cita-se como outra desvantagem dos guias impressos, a dificuldade para atualização das informações, visto que, para isso, é necessário elaborar uma nova publicação.

Vale ressaltar também que as técnicas moleculares estão avançando cada dia mais no ramo de diagnose de doenças de plantas e sementes, porém são de alto custo, principalmente em países subdesenvolvidos como o Brasil, tornando-se, muitas vezes, uma técnica inacessível para muitos pesquisadores.

Visto que a diagnose através de características morfológicas, como *Blotter test* ainda é muito utilizada no Brasil e com base na análise dos resultados alcançados através da validação da presente chave interativa, é possível confirmar que o uso

desse tipo de chave em testes de sanidade de sementes aumenta a acurácia e a precisão dos resultados, além de facilitar o trabalho do avaliador. Resultados semelhantes também foram constatados em outros sistemas especialistas de diagnose de doenças de plantas (YIALOURIS et al., 1996; YIALOURIS et al., 1997; ALVES et al., 2006; ABU-NASER et al., 2008; RISTAINO, 2012), evidenciando a importância desta ferramenta na área.

A presente chave proporciona a interação do usuário com imagens de alta resolução preparadas através da sobreposição e compilação de fotos visando reproduzir fielmente as características fúngicas presentes nas sementes observadas por meio de microscópios óticos e estereoscópios. Por esses motivos, esta chave se mostra superior às demais ferramentas atualmente disponíveis, pois possibilita uma acurácia nos resultados, facilitando os trabalhos de diagnose em Patologia de Sementes e também em Fitopatologia Geral, como certificação sanitária, estações quarentenárias e órgãos de pesquisa e ensino.

Tão importante quanto à eficácia da presente chave é a disponibilidade dessa ferramenta. Neste sentido, a chave interativa que agregou as espécies fúngicas mais frequentes para as culturas em questão está disponível gratuitamente através do endereço eletrônico: <http://www.cvi.ufscar.br/chaves.html> e com planos de expansão para outras espécies comuns em outras culturas, como soja e milho.

## REFERÊNCIAS

ABU-NASER, S. S.; KASHKASH, K. A.; FAYYAD, M. Developing an Expert System for Plant Disease Diagnosis. **Journal of Artificial Intelligence**, v. 2, p. 78-85, 2008.

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. 2. ed. CRC Press, 1996. 560p.

AGRIANUAL 2015. **Anuário da Agricultura Brasileira**. FNP Consultoria e Comércio, São Paulo, 2015, 472p.

AHMED, K. M.; REDDY, C. H. R. A pictorial guide to the identification of seedborne fungi of sorghum, pearl millet, finger millet, chickpea, pigeonpea, and groundnut. India. **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics**, Patancheru, Andhra Pradesh, Índia, n. 34, 1993.

ALVES, M. C. et al. Desenvolvimento e validação de um sistema especialista para identificar fungos na análise sanitária de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 176-186, 2006.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 1. ed. Minnesota: APS Press, 1999.

BAKER, K. F. Seed pathology. In: KOZLOWSKI, T. T. (ed.) **Seed biology: germination, control, metabolism and pathology**. New York: Academic, 1972, v. 2, p. 317-416.

BEGUM, M. M. et al. Taxonomic review of and development of a Lucid Key for Philippine Cercosporoids and related fungi. **Plant Pathology**, p. 1-40, 2012.

BOYD, D. W.; SUN, M. K. Prototyping an expert system for diagnosis of potato diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 10, p. 259-267, 1994.

BOUKET, A. C., et al. Um programa de identificação baseado na Web para *Pythium* espécies. **Arquivos de Fitopatologia e Sanidade Vegetal**, v. 48, p. 475-484, 2015.

BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2009.

BRIDGE, P. D. et al. PENIMAT, a computer-assisted identification scheme for terverticillate *Penicillium* isolates. **Mycol Pap.**, v. 165, p. 1-59, 1992.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 5. ed. Jaboticabal: Funep, 2012. 590 p.

COSTA LIMA, A. **Insetos do Brasil**. Escola Nacional de Agronomia, série didática, 1953.

DHINGRA, O. D. Teoria da Transmissão de Patógenos Fúngicos por Sementes. In: ZAMBOLIN, L. (Ed.). **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: UFV, 2005. p. 11-75.

FARR, D. F. On-line keys: more than just paper on the web. **Taxon**, v. 55, p. 589-596, 2006.

FUJIHARA, R. T. et al. **Insetos de Importância Econômica: guia ilustrado para identificação de famílias**. Botucatu: Fepaf, 2011. 391 p.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

HANLIN, R. T. Illustrated genera of Ascomycetes. St. Paul, MN: **APS Press**, v. 2. 1998.

YIALOURIS, C. P.; SIDERIDIS, A. B. An expert system for tomato diseases. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 14, p. 61-76. 1996.

YIALOURIS, C. P. et al. VEGES - A multilingual expert system for the diagnosis of pests, diseases and nutritional disorders of six greenhouse vegetables. **Computers and Electronics in Agriculture**, v. 19, p. 55-67. 1997.

ISTA - **International Rules for Seed Testing**. Zurich, Switzerland. 2017.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 2005. p. 607-626.

LEGGETT, R.; KIRCHOFF, B. K. Image use in field guides and identification keys: review and recommendations. **AoB Plants**, 2011.

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J., WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de sementes**. Campinas, SP: Fundação Cargill/Abrates-Copasem, 1987. p. 276-298.

JONES, T. H. et al. An expert system for management of *Delia coarctata* (Diptera: Anthomyiidae) in the United Kingdom. **Journal of Economic Entomology**, v. 83, p. 2065-2072. 1990.

MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 88-94. 2001a.

MACHADO, J. C. et al. Inoculação artificial de sementes de soja por fungos, utilizando solução de manitol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 2, p. 95-101. 2001b.

MACHADO, J. C. et al. Uso da restrição hídrica na inoculação de fungos em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 62-67. 2004.

MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 99-2016. 2017.

MAUDE, R. B. **Seedborne diseases and their control: principles and practice**. Wallingford: CAB International, 1996. 280 p.

NAVI, S. S. et al. **A Pictorial Guide for the Identification of Mold Fungi on Sorghum Grain**. India: International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics, 1999.

PITT, J. I. PENNAME, a computer key to common *Penicillium* species. **North Ryde: CSIRO Division of Food Processing**. 1990.

POZZA, E. A. et al., Desenvolvimento e Aplicações de sistemas especialistas e redes neuronais em fitopatologia. **Revista Brasileira de Agroinformática**, v. 2, p. 28-61. 1999.

RISTAINO, J. B. A lucid key to the common species of *Phytophthora*. **Plant Disease**, v. 96, p. 897-903. 2012.

SALISBURY, F. B., ROSS, C. W. **Plant Physiology**. Belmont, Wadsworth. 4. ed. 1991. 422 p.

SCHAAD, N. W., et al. Technical Challenges for Specific, Sensitive Detection of Seed-Borne Bacterial Pathogens. In: GULLINO, M. L.; MUNKVOLD, G. **Global Perspectives on the Health of Seeds and Plant Propagation Material**, 2014.

STEHMANN, J. R.; ECHTERNACHT, L.; TELES, F. Portal de chaves interativas da biodiversidade. Available at: <http://www2.icb.ufmg.br/chaveonline/index.html>. Accessed on September 05, 2017. (2017)

THRANE, U. FUSKEY, an interactive computer key to common *Fusarium* species. **Mycotoxin Research**, p. 50-53, 1991.

WATANABE, T. **Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and keys to species**. London: CRC Press. 2. ed. 2002.

## **CAPÍTULO 2 - ESTUDO DA TRANSMISSÃO DAS RAÇAS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* ATRAVÉS DE SEMENTES DE TOMATE**

Caroline Geraldi Pierozzi, Derrick Mayfield, Adriana Zanin Kronka, Gary Munkvold

**Resumo:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) é o agente causal de murcha em tomate e existem três raças deste patógeno distribuídas pelo mundo. Sabe-se que este patógeno pode ser transmitido via sementes, porém é desconhecida a eficiência de transmissão para as diferentes raças. Neste sentido, avaliou-se a transmissão das três raças de FOL por sementes de tomate, utilizando-se de dois isolados fúngicos de cada raça e para cada um deles foram inoculadas 200 sementes em suspensão de esporos à concentração de  $10^7$  esporos/mL. As sementes inoculadas foram semeadas individualmente em bandejas e mantidas sob condições controladas de luz e umidade até a terceira semanas pós-emergência. Foram avaliadas 100 plântulas por isolado quanto a massa das plântulas, comprimento de raízes e severidade visual da doença. Além disso, pequenos fragmentos da parte aérea e raiz, de cada plântula, foram plaqueados em meio de cultura para posterior confirmação da transmissão via análise molecular. Paralelamente, também foi avaliada a eficiência e viabilidade do tratamento de sementes de tomate no controle de FOL utilizando-se ácido clorídrico (HA) e fosfato trissódico (TSP). Para isso, foram utilizados lotes de sementes inoculados individualmente com as diferentes raças de FOL e posteriormente submetidos aos tratamentos de eficácia com HA e TSP. Os resultados de transmissibilidade demonstraram uma baixa taxa de transmissão das raças 1 e 3 de FOL para plântulas e considerada nula na raça 2, além disso, observou-se uma maior transmissão das raças 1 e 3 para as raízes quando comparada à transmissão destas para a parte aérea das plântulas. Por meio dos resultados de massa das plântulas e comprimento de raízes notou-se que o baixo desenvolvimento de plântulas é inversamente proporcional a elevada transmissão de FOL. Em relação a severidade, observou-se que a doença apresenta-se assintomática em plântulas de tomate. Os resultados dos tratamentos de sementes constataam que o ácido clorídrico apresentou 100% de eficácia no manejo de FOL em sementes de tomate, enquanto que fosfato trissódico foi ineficaz contra as raças.

**Palavras-chave:** Murcha de fusarium. Sanidade de sementes. *Solanum lycopersicum*. Mudas.

**Abstract:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) is causal agent of tomato wilt and there are three races of this pathogen distributed throughout the world. It is known that this pathogen can be transmitted via seeds, but the transmission efficiency for the different races is unknown. In this sense, it was evaluated the transmission of FOL races by tomato seeds, using two fungal isolates from each race, and 200 seeds were inoculated spore suspension at the  $10^7$  spores/mL concentration. The inoculated seeds were individually planted in trays and kept under controlled conditions of light and humidity until completed 3 weeks after emergence. The evaluation consisted in weight, root length and severity of 100 seedlings per isolate. In addition, small sections of shoot and root of each seedling were plated in culture medium for further transmission confirmation via molecular analysis. At the same time, the efficiency and viability of tomato seed treatment in the FOL control was evaluated using hydrochloric acid (HA) and trissodium phosphate (TSP). For this, seeds lots were inoculated individually with the different FOL races were used and subsequently submitted to HA and TSP efficacy treatments. The transmissibility results showed low transmission rate for races 1 and 3 and null for race 2, in addition, a greater transmission of races 1 and 3 to the roots was observed when compared to the transmission of these to the shoot part of seedlings. By means of seedling mass and root length results it was observed that the low seedling development is inversely proportional to the high FOL transmission. In relation to severity, it was observed that the disease is asymptomatic in tomato seedlings. Seed treatment results showed that hydrochloric acid presented 100% efficacy in the management of ineffective against the races.

**Keywords:** Fusarium wilt. Seed health. *Solanum lycopersicum*. Seedlings.

## 2.1 INTRODUÇÃO

Murcha de fusarium é uma importante doença do tomate, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) (ARMSTRONG, ARMSTRONG, 1978; MICHIELSE, REP, 2009), a qual foi reportada pela primeira vez em 1895 na Inglaterra (JONES et al., 1991). Entre os principais sintomas ocasionados pelo patógeno em plântulas de tomate, estão a descoloração das mudas e o bronzeamento dos vasos condutores, enquanto que, em plantas mais velhas, o sintoma mais evidente é o forte amarelecimento das folhas mais baixas (HUANG et al., 2012).

As sementes são potenciais fontes de inóculo de vários patógenos, podendo dispersá-los a longas distâncias ou introduzi-los em áreas isentas (BAKER, 1972; MAUDE, 1988; ZAMBOLIM et al., 2000). Alguns fungos habitantes de solo, como os do gênero *Fusarium*, quando associados às sementes, podem limitar a germinação e, conseqüentemente, provocar infecções nas plântulas recém emergidas (PEREIRA et al., 2015).

Atualmente, existem três raças de FOL com distribuição mundial, sendo a raça 1 descrita pela primeira vez no início do século XX (BOHN; TUCKER, 1939), a raça 2 descoberta antes de 1940 (ALEXANDER; TUCKER, 1945) e a raça 3 no ano de 1982 (GRATTIDGE; OBRIEN, 1982; VOLIN; JONES, 1982). As raças 1 e 2 estão presentes em todos os continentes (TOKESHI; GALLI 1966; STRAVATO et al., 1999) e a raça 3 reconhecidamente restrita no Brasil (REIS et al., 2005), Austrália (GRATTIDGE; OBRIEN, 1982), Estados Unidos (VOLIN; JONES, 1982), México (VALENZUELA-URETA et al., 1996), Reino Unido, Nova Zelândia, Chile, Africa do Sul e Coréia (JACOBS et al., 2013; CHOI et al., 2013; SEPÚLVEDA-CHAVERA et al., 2014).

No Brasil a raça 3 pode ser encontrada apenas nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Bahia (MACEDO, 2016). É importante citar que existem relatos que a introdução de FOL no Brasil foi realizada através de sementes importadas contaminadas (REIS et al., 2004).

Neste sentido, o uso de sementes isentas de patógenos é a principal forma profilática frente contaminações de novas áreas, principalmente quando se trata de microrganismos de solo, como é o caso do *Fusarium* spp., que possuem clamidósporos como estruturas de resistência, permanecendo viáveis no solo por mais de dez anos (NELSON, 1981; KUROZAWA; PAVAN, 2005).

Para o manejo de fungos fitopatogênicos associados às sementes, é comum a prática do tratamento químico de sementes com fungicidas sintéticos, uma alternativa simples e de elevada eficácia. No entanto, poucas são as moléculas químicas registradas para o tratamento de sementes olerícolas (PEREIRA et al., 2015).

O uso de genótipos resistentes também se revela como uma eficiente ferramenta no manejo de doenças do tomateiro, praticado principalmente contra FOL. Contudo, muitas vezes, a fonte de resistência está em genótipos de baixa expressão das características agrônômicas desejáveis, como produtividade e qualidade para mercado (LARA, 1991).

Muitos são os estudos sobre FOL, comprovando a importância deste patógeno como limitante à produção agrícola. Estes evidenciam desde características da espécie e suas raças, sua distribuição no planeta até técnicas de manejo, incluindo o desenvolvimento e emprego de genótipos resistentes (BIJU et al., 2017; REIS et al., 2005). Entretanto, trabalhos envolvendo a transmissão de FOL por sementes são raros e antigos, havendo poucas publicações a respeito (MENZIES; JARVIS, 1994).

Diante destes fatos e da necessidade de melhor entender os processos de transmissão desse patógeno, o presente trabalho objetivou determinar, via técnicas moleculares, a taxa de transmissão das diferentes raças conhecidas de FOL via sementes de tomate, e ao mesmo tempo avaliar a eficiência de tratamentos de sementes alternativos para o controle deste patógeno.

## **2.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.2.1 Determinação das raças**

Para determinar as raças de FOL foi realizada a extração de DNA de dez isolados (Tabela 1) e, em seguida, foi feito o PCR utilizando primers específicos. Essas técnicas estão descritas a seguir.

**Tabela 1 - Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizados na determinação das raças.**

Número do isolado	Coleção*	Localização
26034	NRRL	Florida, EUA
26037	NRRL	Bradenton, Flórida, EUA
26200	NRRL	Ohio, EUA
26202	NRRL	Flórida, EUA
26203	NRRL	Itália
26380	NRRL	Manatee county, Flórida, EUA
26383	NRRL	Gadsden county, Flórida, EUA
54003	NRRL	St. Paul, MN, EUA
FOL BR	Instituto Biológico de São Paulo	Brasil
FO-TO-SH	Lab. Seed Science Center -ISU	Desconhecido

\*NRRL: Agricultural Research Service (Culture Collection).

### 2.2.2 Extração de DNA

Os isolados cresceram em meio de cultura BDA (batata, dextrose e agar) durante cinco dias a 25°C com um fotoperíodo de 12 h. A extração de DNA foi feita a partir do micélio fúngico de cada isolado. Para isso, utilizou-se o método de brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB) (DOYLE; DOYLE, 1997): 0,5 g de micélio fúngico recém colhido foi moído em nitrogênio líquido com o auxílio de um pistilo até obtenção de um pó muito fino. O pó foi suspenso em 600 µL de solução de CTAB à concentração de 2%. A solução adicionada ao pó fúngico foi incubada durante uma hora a 65°C em um termobloco com agitação incubador a 400 rpm. O DNA foi extraído adicionando um volume de 600 µL de Clorofórmio: Isoamil Álcool (24: 1 V / V) e misturado suavemente até o líquido se tornar opaco e, imediatamente, centrifugado a 12000 rpm durante dez minutos. O sobrenadante aquoso, observado logo após a centrifugação, foi removido e colocado em um novo tubo. Este sobrenadante foi precipitado com 1000 µL de isopropanol gelado e os tubos invertidos várias vezes para misturar. A mistura foi centrifugada a 12000 rpm durante dez minutos. Posteriormente, foi observada a formação de um pellet, o qual foi lavado com 1000 µL de etanol a 70% duas vezes, seco completamente e dissolvido em 50 µL de água estéril. O DNA foi quantificado usando um espectrofotômetro e armazenado a -20°C até o processamento. Este método de extração foi utilizado em todas as etapas deste estudo.

### 2.2.3 Análises por PCR

Os conjuntos de primers, uni, sp13, sp23 e sprl, descritos por Hirano e Arie (2006), foram utilizados neste estudo. Estes pares de primers foram baseados nas diferenças de nucleótidos que apareceram entre os tipos patogênicos de FOL. O uso do par de primers uni amplifica os fragmentos dos isolados de FOL e FORL (*F. radialis-lycopersici*), com o par de primers sp13 obtiveram-se apenas fragmentos de isolados de FOL raças 1 e 3 e o par de primers sp23 amplifica fragmentos dos isolados de FOL raças 2 e 3. O par de primers sprl produz fragmentos dos isolados de FORL, mas não de FOL (HIRANO; ARIE, 2006) (Tabela 2). Os padrões de amplificação por PCR para as raças FOL podem ser vistos na Tabela 3.

**Tabela 2 - Conjunto de primers específicos usado neste trabalho para determinar as raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.**

Código*	Sequência (5'-3')	Comprimento da amplificação (pb)	Produto Esperado
UNI – F	ATCATCTTGTGCCAACTTCAG	670-672	FOL e FORL
UNI – R	GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA		
SP13 – F	GTCAGTCCATTGGCTCTCTC	445	FOL raça 1 e raça 2
SP13 – R	TCCTTGACACCATCACAGAG		
SP23 – F	CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA	518	FOL raça 2 and raça 3
SP23 – R	GCAACAGGTCGTGGGGAAAA		
SPRL – F	GATGGTGGAACGGTATGACC	947	FORL
SPRL – R	CCATCACACAAGAACACAGGA		

\*F: Forward / R: Reverse

**Tabela 3 – Primers usados neste trabalho para determinar as raças de FOL.**

	Primer			
	uni	sp13	sp23	Sprl
FOL raça 1	+	+	-	-
FOL raça 2	+	-	+	-
FOL raça 3	+	+	+	-
FORL	+	-	-	+

Os produtos da reação de PCR (10 µL) continham 2 µL da amostra de DNA (50 ng / µL), adicionados de 2X Invitrogen Platinum taq, 10 µL de cada primer, sendo a amplificação do DNA realizada no termociclador Nexus Mastercycler (Eppendorf). O ciclo foi composto pelas seguintes etapas: 95°C por dois minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 30 segundos, anelamento à 57°C por 30 segundos,

elongação à 72°C por 45 segundos; e uma elongação final à 72°C durante um minuto (adaptado de HIRANO; ARIE, 2006). Os produtos de PCR foram analisados através da eletroforese em gel de agarose (2%) em corrida a 100 V durante 30 minutos. As bandas foram visualizadas usando o Bio-Rad Gel Doc System.

#### 2.2.4 Isolados fúngicos usados no estudo de transmissão

Foram utilizados seis isolados neste estudo. Dois isolados de cada raça foram selecionados de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4 – Isolados fúngicos utilizados no estudo de transmissão.**

Raça/Número do isolado	Coleção	Cultura	Origem
Raça 1 26380 MMBF 01/96	NRRL* Instituto Biológico de São Paulo	Tomate Tomate	Manatee county, Flórida, EUA Brasil
Raça 2 26202 54003	NRRL NRRL	Tomate Tomate	Flórida, EUA St. Paul, MN
Raça 3 26383 26203	NRRL NRRL	Tomate Tomate	Gadsden county, Flórida, EUA Itália

\*NRRL: Agricultural Research Service (Culture Collection).

Os isolados foram selecionados baseando-se nos resultados prévios das raças. Foram obtidos a partir de três diferentes origens geográficas: Brasil, Estados Unidos e Itália. Os isolados cresceram rotineiramente em meio de cultura BDA (batata, dextrose e agar) a 25 °C e foram armazenados em sílica.

#### 2.2.5 Inoculação das sementes

Sementes de tomate, cv. Bonny Best, altamente suscetível a FOL (LARKIN; FRAVEL, 2002) foram utilizadas neste estudo. Essas sementes foram desinfestadas durante um minuto em hipoclorito 10% e lavadas três vezes em água estéril, antes da inoculação. Para o preparo da suspensão de esporos, os isolados cresceram previamente em meio de cultura BDA durante cinco dias a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. Posteriormente, foi coletado o micélio de três placas através da adição de 10 mL de água esterilizada e raspagem da superfície com o auxílio de uma alça. O inóculo foi filtrado para remover fragmentos miceliais e a concentração de conídios foi

quantificada por hemocitômetro. A concentração foi ajustada para  $1 \times 10^7$  conídios / mL com um volume final de 30 mL. Para a inoculação, 200 sementes foram embebidas em cada uma das suspensões durante 10 minutos e foram secas durante a noite. As sementes de controle foram embebidas em água estéril por 10 minutos e secas da mesma forma que os outros tratamentos.

### **2.2.6 Ensaio em câmara de crescimento**

Os seis isolados foram testados quanto à sua capacidade de transmitir FOL para mudas de tomate. Após inoculadas, 200 sementes de cada isolado foram plantadas em bandejas com células e mantidas em câmara de crescimento à 25°C, 90% de umidade e iluminação constante. Três semanas após a emergência, as mudas foram removidas das bandejas, cuidadosamente lavadas e embaladas em toalhas de papel umedecidas até a avaliação. Foi avaliada a massa da plântula e o tamanho da raiz. Para avaliar a severidade da doença, utilizou-se um índice de doença que varia de 0 a 4 (0, sem sintomas; 1, hipocótilo ligeiramente inchado e / ou curvado; 2, um ou dois feixes vasculares marrons em hipocótilo; 3, pelo menos dois feixes vasculares marrons e crescimento distorção; 4, todos os feixes vasculares são castanhos, planta morta) (REP et al., 2004).

Um fragmento de raiz e outro da parte aérea foram desinfestados por um minuto em hipoclorito (10%), lavados três vezes em água estéril e depois plaqueados em meio específico (meio PPA ou Nash-Snyder) até o início do crescimento micelial. Quando observado este crescimento, rapidamente, um pequeno pedaço deste micélio foi transferido para uma nova placa com meio de cultura BDA (batata, dextrose e agar) que foi utilizada para extração de DNA. O protocolo de extração de DNA é o mesmo descrito anteriormente. Após a extração de DNA, foram realizadas análises por PCR para identificar as raças FOL, conforme descrito anteriormente.

Para o cálculo da taxa de transmissão (TT) de FOL da semente para a plântula, foram analisados os resultados do PCR tanto para a parte aérea quanto para a raiz e calculada a TR através da fórmula:  $TT(\%) = [(TI(\%)/IS(\%))] \times 100$ , sendo que TT=taxa de transmissão, TI= taxa de infecção em fragmentos da raiz e parte aérea, IS=incidência de FOL nas sementes inoculadas (100% de incidência de FOL nas sementes) (LIMONARD, 1966).

### **2.2.7 Tratamento de sementes**

Para o tratamento de sementes com ácido clorídrico (HA) e fosfato trisódico (TSP), foram utilizadas 100 sementes para cada raça. Neste ensaio foram utilizados um isolado de cada raça de FOL, sendo eles: 26380 (raça 1), 26202 (raça 2) e 26383 (raça 3). As sementes foram inoculadas, como descrito anteriormente, tratadas (HA e TSP) e distribuídas em placas contendo meio de cultura (BDA). Para o controle, as sementes não foram tratadas, apenas inoculadas com as três raças de FOL.

Para as sementes tratadas com HA, foi preparada uma solução de HCl a 10%. As sementes foram imersas nesta solução durante 30 minutos e 1 hora e depois lavadas 10 a 12 vezes em água estéril. Após a secagem, as sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo BDA (20 sementes / placa).

Para o tratamento TSP, foi preparada uma solução a 10% de TSP. As sementes foram embebidas durante 15 minutos nesta solução e depois lavadas em água estéril durante 5 minutos. Após a secagem, as sementes foram distribuídas em placas de Petri contendo BDA (20 sementes / placa).

A avaliação consistiu em analisar a presença ou ausência de FOL nas sementes e calcular a eficácia de controle desses tratamentos a partir da fórmula proposta por Abbott (1925):  $E\% = [(CT) / C] \times 100$  (E%: porcentagem de eficácia de tratamento avaliado C:% de gravidade do controle - número de sementes com FOL; T:% de gravidade do tratamento - número de sementes com FOL).

### **2.2.8 Análise estatística**

O delineamento experimental para os testes de desenvolvimento de plântulas (massa e comprimento de raiz) foi o inteiramente casualizado, com as repetições especificadas em cada testes, conforme descrito anteriormente. Os dados foram analisados pelo teste F e as médias submetidas à comparação pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

## **2.3 RESULTADOS**

### **2.3.1 Determinação das raças**

A seleção dos isolados utilizados neste estudo baseou-se na análise dos resultados gerados pela separação eletroforética dos produtos de PCR para cada isolado testado (Figura 1).

**Figura 1 – Separação eletroforética de produtos de PCR para detectar as raças dos isolados de FOL.**



### Legenda

Coluna	Isolado	Par de primer	Tamanho do produto (pb)	Resultado	Raça	Origem
1	Ladder	-	-			
2	Controle	-	-			
3	26202*	SP13f/SP13r	445	-		Flórida, EUA
4	26202	SP23f/SP23r	518	+	Raça 2	
5	26034	SP13f/SP13r	445	-		Flórida, EUA
6	26034	SP23f/SP23r	518	-	FORL	
7	26380*	SP13f/SP13r	445	+		Flórida, EUA
8	26380	SP23f/SP23r	518	-	Raça 1	
9	26037	SP13f/SP13r	445	+		Flórida, EUA
10	26037	SP23f/SP23r	518	-	Raça 1	
11	FO-TO-SH	SP13f/S P13r	445	-		Desconhecido
12	FO-TO-SH	SP23f/SP23r	518	+	Raça 2	
13	54003*	SP13f/SP13r	445	-		Minnesota, EUA
14	54003	SP23f/SP23r	518	+	Raça 2	
15	26383*	SP13f/SP13r	445	+		Flórida, EUA
16	26383	SP23f/SP23r	518	+	Raça 3	
17	26200	SP13f/SP13r	445	+		Ohio, EUA
18	26200	SP23f/SP23r	518	-	Raça 1	
19	26203*	SP13f/SP13r	445	+		Itália
20	26203	SP23f/SP23r	518	+	Raça 3	
21	Fol BR*	SP13f/SP13r	445	+		Brasil
22	Fol BR	SP23f/SP23r	518	-	Raça 1	

**\*Isolados selecionados.**

O critério de seleção utilizado foi o de eleger apenas 2 isolados por raça e diversificar a região geográfica de origem dos isolados. Sendo assim, para a raça 1 foi selecionado um isolado da Flórida, EUA e outro do Brasil. Já para a raça 2, os

isolados são originários dos EUA (Flórida e Minnesota) e, para a raça 3, um isolado advindo da Itália e outro da Flórida, EUA.

### 2.3.2 Ensaio em câmara de crescimento

Em relação a massa média de plântulas provenientes de sementes inoculadas com os isolados da raça 1 (FOL-BR e 26380) e 3 (26203 e 26383) diferiram do controle (Tabela 5), apresentando as menores médias de massa de plântulas 0,69g; 0,98g; 1,11g e 0,84g, respectivamente. Destacam-se os resultados obtidos para FOL-BR (raça 1) e 26383 (raça 3) com as menores médias, 0,69g e 0,84g, respectivamente.

**Tabela 5 - Massa média das plântulas, comprimento médio de raiz, incidência de sintomas e taxa de transmissão dos seis diferente isolado comparados com o controle.**

Raça	Tratamento (Isolado)	Massa (g)*	Compr. de raiz (cm)*	Incidência de sintomas (%)**	Taxa de transmissão (%)***		
					Parte aérea	Raiz	Total
1	FOL - BR	0,69 d	17,18 ab	0	1	19	20
	26380	0,98 bc	16,23 ab	0	0	0	0
2	26202	0,96 bc	16,09 ab	0	0	0	0
	54003	1,32 a	15,50 b	0	0	0	0
3	26203	1,11 b	17,35 ab	0	0	0	0
	26383	0,84 cd	16,48 ab	1	2	10	12
Control	Control	1,30 a	18,62 a	0	0	0	0
F		29,34	2,88	-	-	-	-
P		<0,01	<0,01	-	-	-	-
CV%		40,63	35,05	-	-	-	-

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

\*\*Porcentagem da incidência de sintomas ( $IS=(S \times 100)/T$ , sendo que IS=Incidência dos sintomas; S=número de plântulas com sintomas; T= total de plântulas analisadas.

\*\*\* $TT(\%)=[(TI(\%)/IS(\%))] \times 100$ , sendo que TR=taxa de transmissão, TI= taxa de infecção em fragmentos da raiz e da parte aérea, IS=incidência de FOL nas sementes inoculadas (100% de incidência).

Já para plântulas de sementes inoculadas com os isolados da raça 2, somente o isolado 26202 diferiu do controle, apresentando média de massa de plântula igual a 0,96g.

Ao analisar os dados de comprimento de raiz (Tabela 5), observa-se que apenas as plântulas provenientes de sementes inoculadas com o isolado 54003 (raça 2) diferenciaram do controle, apresentando comprimento médio de 15,50 cm. Já os demais tratamentos não diferiram estatisticamente do controle, nem entre si.

Em relação aos resultados de incidência de sintomas, apenas uma plântula analisada no estudo, de um total de 700 plântulas, apresentou feixe vascular com coloração marrom característico da infecção por FOL (Figura 2), perfazendo 1% de incidência no tratamento com o isolado 26383 (raça 3) (Tabela 5).

**Figura 2 - Sintoma característico de FOL em plântulas de tomate. Vaso condutor com coloração marrom.**



Os resultados de taxa de transmissão se basearam nos testes de PCR (Tabela 6). Entre 20 amostras positivas para a raça 1 (FOL BR), 19 são provenientes da raiz e 1 com origem da parte aérea. Para a raça 2 não observou-se transmissão de FOL pelas sementes, tanto para a parte aérea quando para as raízes. Ao analisar os resultados para a raça 3 foi detectada a transmissão de FOL em 10 amostras de raízes e duas amostras de parte aérea (Tabela 6).

**Tabela 6. Resultados positivos do PCR, usando os primers uni, sp13, sp23 e sprl, para amostras de plântulas (raiz e parte aérea) provenientes de sementes inoculadas com as diferentes raças de FOL.**

Raça inoculada	Tecido*	Isolado	Primers				Resultado das raças
			Uni	SP13	SP23	SPRL	
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Parte aérea	Fol BR	+	+	-	-	1
1	Raiz	Fol BR	+	+	-	-	1
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Parte aérea	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Parte aérea	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3
3	Raiz	26383	+	+	+	-	3

\*Cada amostra é originária de uma única planta.

### 2.3.3 Tratamento de sementes

Ao analisar os resultados obtidos para eficácia média dos tratamentos (%), observou-se que todas as sementes inoculadas com isolados das três raças de FOL

e posteriormente tratadas com ácido clorídrico por 30 minutos foram suficientes para atingir 100% de controle (Tabela 7). Já o uso de TSP (fosfato trisódico) para o controle das três raças de FOL não se mostrou eficaz, visto que os resultados revelaram 0% de eficácia para este tratamento.

**Tabela 7. Porcentagem de eficácia dos tratamentos de sementes de tomate com ácido clorídrico (HA) e fosfato trisódico (TSP)**

<b>Tratamento</b>	<b>Isolado</b>	<b>Raça</b>	<b>% Eficácia*</b>
Controle	26380	1	-
Controle	26202	2	-
Controle	26383	3	-
HA 30 minuto	26380	1	100
HA 30 minuto	26202	2	100
HA 30 minuto	26383	3	100
HA 1 hora	26380	1	100
HA 1 hora	26202	2	100
HA 1 hora	26383	3	100
TSP	26380	1	0
TSP	26202	2	0
TSP	26383	3	0

\*Eficácia calculada pela fórmula de Abbott (1925).

## 2.4 DISCUSSÃO

### 2.4.1 Ensaio em câmara de crescimento

A menor massa média de plântulas foi obtida nos tratamentos FOL-BR (raça 1) e 26383 (raça 3), que apresentaram a maior taxa de transmissão de FOL, corroborando com os resultados de Duffy and Défago (1999), que, estudando a influência de fatores nutricionais no desenvolvimento de *Fusarium* em tomate, também observaram esse fenômeno do baixo desenvolvimento de plântulas ser inversamente proporcional a elevada transmissão da doença. Esta característica de baixo desenvolvimento em plântulas infectadas com *Fusarium* spp. é o reflexo dos sintomas ocasionados pelo fungo, como a indução do fechamento dos estômatos e consequente redução da taxa fotossintética, seguida pela murcha da planta (JONES et al., 1991). Além disso, *Fusarium* spp. ainda afeta o fluxo ascendente de água e nutrientes na planta em decorrência da colonização e obstrução do xilema (AGRIOS, 2005).

Neste trabalho, observou-se a transmissão das raças 1 e 3 de FOL via sementes. A transmissão da raça 1 foi de 1% para a parte aérea e 19% para as raízes enquanto para a raça 3 foi de 2% para a parte aérea e 10% para as raízes (Tabela 5). Essa transmissibilidade é considerada baixa quando comparada aos estudos de transmissão de diferentes espécies de *Fusarium* em outras culturas. Sartori et al. (2004) obtiveram taxas de transmissão de 34,9% e 14,6% para raízes e parte aérea, respectivamente quando estudaram a transmissão de *Fusarium moniliforme* via sementes de milho, ou seja, taxas bastante elevadas quando comparadas às obtidas no presente trabalho. Estes fatos comprovam que a transmissão de fungos via sementes pode variar de acordo com o patógeno fúngico, a raça em questão e o hospedeiro, havendo ainda a influência de fatores abióticos como o clima.

Por outro lado, mesmo com essa baixa transmissibilidade de FOL das sementes para as plântulas em tomate, ainda gera-se preocupação, uma vez que já foi comprovado que menos de 1% de sementes contaminadas em um lote pode provocar elevadas perdas no campo e estufas (GULLINO et al., 2014). Além disso, as perdas são especialmente severas quando a infecção ocorre no estágio inicial de desenvolvimento (DUFFY; DÉFAGO, 1999), situação esta, típica no caso de infecção via sementes.

Em relação à incidência de sintomas, somente uma planta avaliada apresentou sintomas comuns de murcha, caracterizados inicialmente pela coloração marrom dos vasos condutores (Figura 2). Esta observação revela que FOL, quando transmitido por sementes, mantém-se assintomático no estágio de plântulas. Segundo Kurozawa e Pavan (2005), no tomateiro é comum o surgimento de sintomas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* somente após o início de florescimento e frutificação, corroborando com os resultados aqui encontrados. O mesmo já foi relatado em outras plantas hospedeiras, como milho, que também se mantém assintomático após a infecção por *Fusarium verticillioides* via sementes (WILKE et al., 2007).

O desenvolvimento radicular não foi afetado pelo FOL, não havendo diferenciação entre os tratamentos (Tabela 5).

#### **2.4.2 Tratamento de sementes**

O uso de materiais resistentes ao FOL é a principal medida de controle dessa doença (KUROZAWA; PAVAN, 2005), havendo genótipos resistentes às três raças. Entretanto, esta não pode ser considerada uma tática permanente, uma vez que é

possível o surgimento de novas raças virulentas com habilidades em superar os mecanismos de resistência do hospedeiro, demandando um constante desenvolvimento de novos materiais resistentes (ELIAS et al., 1993; MARLATT et al., 1996). Outra limitação no uso de genótipos resistentes ao FOL é a falta de características comercialmente desejáveis, como na Flórida, onde existem variedades resistentes, mas com baixa qualidade de frutos, tornando-se ferramentas obsoletas (OZORES-HAMPTON et al., 2010).

O tratamento de sementes (TS) também é uma excelente ferramenta no manejo do FOL em tomate, mesmo não havendo muitas moléculas químicas registradas para tal finalidade, sendo comum o emprego do tiabendazol, no Brasil, e thiram, nos EUA.

Grandes empresas também estão constantemente desenvolvendo tecnologias no ramo de tratamento de sementes (LEE, 2004; LOVIC; HOPKINS, 2003), porém nem sempre essas tecnologias estão disponíveis para pequenas empresas e público em geral (LING, 2010). Neste sentido, é função da pesquisa divulgar resultados obtidos de manejo e eficácia de métodos de controle de doenças para servir de base a novas pesquisas e para o amplo conhecimento e acesso da comunidade interessada.

No presente trabalho, constatou-se que o uso de Fosfato Trissódico (TPS) no controle de FOL em sementes de tomate não foi eficaz, diferentemente da sua aplicação visando ao controle de *Pepino mosaic virus* (PepMV) em tomate, onde se apresentou eficiente, visto que erradicou 98,2% do patógeno e não afetou a germinação das sementes (CÓRDOBA-SELLÉS et al., 2007). No entanto, vale ressaltar que os autores utilizaram três horas de imersão em solução 10% TPS, enquanto que no presente trabalho as sementes ficaram imersas em solução por apenas 15 minutos. Este fato pode justificar a ineficácia do TSP para o controle de FOL em tomate, visto o curto tempo de imersão, sendo necessários novos estudos considerando períodos mais longos de imersão.

Ling (2010), também estudando *Pepino mosaic virus* em sementes de tomate, obteve controle do patógeno com o uso de TSP (10%) por duas horas, sem afetar a germinação das sementes. O autor também testou Ácido Clorídrico (HA) em diferentes concentrações (1,5 e 1,25%) e diferentes tempos de imersão (30 min, 1 h e 2h), porém o controle foi parcial, apenas 50%, e também não afetou a germinação. No presente trabalho, o tratamento com HA foi eficaz no controle de FOL em sementes de tomate, porém a concentração da solução foi maior (10%) que a testada por Ling (2010).

Menzies e Jarvis (1994) testaram HA no controle de FOL e obtiveram uma redução, mas não a completa erradicação do patógeno nas sementes, após imersão destas por 10 minutos ou 1 hora em solução de HA. Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram com os obtidos por Menzies e Jarvis (1994).

Diante destes resultados, pode-se concluir que os estudos em relação ao tratamento de sementes de tomate com ácido clorídrico e fosfato trisódico no controle de FOL ainda precisam ser mais aprofundados, como diversificar os tempos de imersão e avaliar a influência desses tratamentos sobre os aspectos fisiológicos das sementes.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 18, p. 265-267, 1925.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005.
- ALEXANDER, L. J.; TUCKER, C. M. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **J Agr Res**, v. 70, p. 303–313. 1945.
- ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K. Formae speciales and races of *Fusarium oxysporum* causing wilts of cucurbitaceae. **Phytopathology**, v. 68, p. 19–28, 1978.
- BAKER, H. G. Seed weight in relation to environmental conditions in California. **Ecological Society of America**, v. 53, p. 997-1010, 1972.
- BIJU, V. C. et al. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Molecular Plant Pathology**, v. 83, 2017.
- CHOI H-W. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing fusarium wilt on tomato in Korea. **Plant Disease**, v. 97, p. 1377, 2013.
- CÓRDOBA-SELLÉS, M. C. et al. Seed transmission of *Pepino mosaic virus* and efficacy of tomato seed disinfection treatments. **Plant Disease**, v. 91, p. 1250-1254, 2007.
- DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.
- DUFFY, B. K.; DÉFAGO, G. Macro and microelement fertilizers influence the severity of Fusarium Crown and Root Rot of tomato in a soilless production system. **Hort. Science**, v. 34, p. 287-291, 1999.
- ELIAS, K. S. et al. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 6, p. 565-572, 1993.
- GRATTIDGE, R.; O'BRIEN, R. G. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease** v. 66, p. 165–166, 1982.
- GULLINO, M. L.; GILARDI, G.; GARIBALDI, A. Seed-Borne Fungal Pathogens of Leafy Vegetable Crops. In: GULLINO, M. L.; MUNKVOLD, G. **Global Perspectives on the Health of Seeds and Plant Propagation Material**. p. 47-59, 2014.
- HIRANO, Y.; ARIE, T. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **J Gen Plant Pathol**, v. 72, p. 273–283, 2006.

- JACOBS, A.; GOVENDER, R.; VAN HEERDEN, S. W. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing tomato wilt in South Africa. **Australasian Plant Disease**, v. 8, p. 145-147, 2013.
- JONES, J. B. et al. Compendium of tomato diseases. **APS Press**, St. Paul, Minn, 1991.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do Tomateiro. In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 607-626, 2005.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, v. 2, p. 336, 1991.
- LARKIN, R. P.; FRAVEL, D. R. Effects of varying environmental conditions on biological control of Fusarium Wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp. **Phytopathology**, v. 92, p. 1160-1166, 2002.
- LEE, J. M. Advances in seed treatments for horticultural crops. **Chronica Hortic**, v. 44, p. 11-20, 2004.
- LIMONARD, T. A modified blotter test for seed health. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 72, p. 319-321, 1966.
- LING, K. Effectiveness of chemo- and thermotherapeutic treatments on *Pepino mosaic virus* in tomato seed. **Plant Disease**, v. 94, p. 325-328, 2010.
- LOVIC, B. R., AND HOPKINS, D. L. Production steps to reduce seed contamination by pathogens of cucurbits. **Hort Technology**, v. 13, p. 50-54, 2003.
- MACEDO, A. Projeto de melhoramento genético desenvolve cultivares resistentes às raças de *Fusarium oxysporum*. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/11127012/projeto-de-melhoramento-genetico-desenvolve-cultivares-resistentes-as-racas-do-fusarium-oxysporum>. Acesso em: 12 out. 2017.
- MARLATT, M. L.; CORREL, J. C.; KAUFMANN, P. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. **Plant Disease**, v. 80, p. 1336-1342, 1996.
- MAUDE, R. B. Achievements and objectives in research on seed-borne diseases of vegetables. In: NASSER, L. C.; WETZEL, M. M.; FERNANDES, J. M. (Eds.) **Seed Pathology: international Advanced course, proceedings**. Brasília, **ABRATES**, p. 267-275, 1988.
- MENZIES, J. C.; JARVIS, W. R. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radices-lycopersici*. **Plant Pathology**, v. 43, p. 378-386, 1994.
- MICHIELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Mol Plant Pathol**, v. 10, p. 311-324, 2009.

NELSON, P. E. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In: MACE, M. E.; BELL, A. A.; BECKMAN, C. H. (Eds). **Fungal Wilt Diseases of Plants**. Academic Press, New York, p. 51-80, 1981.

OZORES, M. P.; AVOY, E. M. C.; SARGENT, S. A.; ROBERTS, P. D. Evaluation of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV) and Fusarium Crown Rot (FCR) resistant tomato variety under commercial conditions in southwest Florida. In: **Tomato Research Report 2009-2010**. Florida Tomato Committee, p. 20, 2010.

PEREIRA, R. B. et al. **Tratamento de sementes de hortaliças**. Embrapa, Brasília, DF, Brazil, 2015.

REIS, A. et al. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2004. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/778824/1/bpd2.pdf>. Acesso em: 12 out. 2017.

REIS, A. et al. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 426-428, 2005.

REP, M. et al. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. **Mol. Microbiol.**, v. 53, p. 1373-1383, 2004.

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da Transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 456-458, 2004.

SEPÚLVEDA-CHAVERA, G. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes in the Azapa Valley of Chile. **Plant Disease**, v. 98, p. 1432, 2014.

STRAVATO, V. M.; BUONAURO, R.; CAPPELLI, C. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 on tomato in Italy. **Plant Disease**, v. 83, p. 967. 1999.

TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Wr) Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v. 23, p. 195–209, 1966.

VALENZUELA-URETA, J. G. et al. First report of Fusarium wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in México. **Plant Disease**, v. 80, p.150, 1996.

VOLIN, R. B.; JONES, J. P. A new race of Fusarium wilt of tomato in Florida and sources of resistance. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v. 95, p. 268–270, 1982.

ZAMBOLIM, L.; CASA, R. T.; REIS, E. M. Sistema plantio direto e doenças em plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 585-595, 2000.

WILKE, A. L.; BRONSON, C. R.; TOMAS, A.; MUNKVOLD, G. P. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v. 91, p. 1109-1115, 2007.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa objetivou enfatizar a problemática em torno da associação entre microrganismos fúngicos e sementes, já que, dentro da Fitopatologia, muitas vezes, não é destinada a devida atenção a este setor. Esta informação pode ser confirmada através da própria legislação brasileira, que não torna obrigatória a realização de testes de sanidade pelas certificadoras antes da liberação do comércio interno de lotes de sementes, ficando restrito apenas às sementes importadas.

Acredita-se que a chave interativa de identificação de fungos em sementes, desenvolvida no presente trabalho, incentivará o estudo e desenvolvimento de novas ferramentas que facilitem a diagnose de doenças fitopatogênicas, tornando-a mais dinâmica e prática. Além disso, ferramentas simplificadas e de linguagem mais direta ampliam a acessibilidade desses instrumentos, atendendo um extenso público, que atinge desde pesquisadores até produtores.

Estudos de transmissão de fungos através de sementes são raros, sendo este fato justificado pela baixa transmissibilidade de microrganismos via sementes. Porém, pesquisas comprovam que baixas incidências de certos patógenos em um lote de sementes, em torno de 1% de contaminação, pode acarretar em graves perdas na lavoura, independentemente da cultura produzida. Sendo assim, este estudo apresentou taxas de transmissão preocupantes, chegando a alcançar valores próximos a 20% de transmissibilidade de FOL para as raízes de tomate, comprovando e enfatizando a importância do avanço da pesquisa neste setor, visando buscar demonstrar a verdadeira importância da disseminação de fungos através das sementes, já que estas são o principal meio de propagação das culturas agricultáveis no mundo.

## REFERÊNCIAS

- BOUKET, A. C., et al. Um programa de identificação baseado na Web para *Pythium* espécies. **Arquivos de Fitopatologia e Sanidade Vegetal**, v. 48, p. 475-484, 2015.
- BRASIL – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília, 2009.
- CARVALHO, N. M. de; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. Jaboticabal: Funep, 2012. 5 ed. p. 590.
- CHOI, H. W. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing fusarium wilt on tomato in Korea. **Plant Disease**, v. 97, p. 1377, 2013.
- DHINGRA, O. D. Teoria da Transmissão de Patógenos Fúngicos por Sementes. In: ZAMBOLIN, L., et al. **Sementes: Qualidade Fitossanitária**. Viçosa: UFV. 2005. 11-75 p.
- ELIAS, K. S. et al. Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Restriction fragment length polymorphisms provide genetic evidence that vegetative compatibility group is an indicator of evolutionary origin. **Mol. Plant-Microbe Interact**, v. 6, p. 565-572, 1993.
- GRATTIDGE, R.; O'BRIEN, R. G. Occurrence of a third race of Fusarium wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease** v. 66, p. 165–166, 1982.
- JACOBS, A.; GOVENDER, R.; VAN HEERDEN, S. W. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 causing tomato wilt in South Africa. **Australasian Plant Disease**, v. 8, p. 145-147, 2013.
- KUROZAWA, C.; PAVAN, M. Doenças do tomateiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 2005. p. 607-626.
- LARA, F. M. **Princípios de resistência de plantas a insetos**. São Paulo: Ícone, v. 2, p. 336, 1991.
- LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J., WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de sementes**. Campinas, SP: Fundação Cargill/Abrates-Copasem, 1987. p. 276-298.
- MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. **Studies in Mycology**, v. 86, p. 99-2016. 2017.
- MARLATT, M. L.; CORREL, J. C.; KAUFMANN, P. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. **Plant Disease**, v. 80, p. 1336-1342, 1996.
- MAUDE, R. B. Achievements and objectives in research on seed-borne diseases of vegetables. In: NASSER, L. C.; WETZEL, M. M.; FERNANDES, J. M. (Eds.) **Seed**

**Pathology:** international Advanced course, proceedings. Brasília, **ABRATES**, p. 267-275, 1988.

PEREIRA, R. B. Et al. **Tratamento de sementes de hortaliças**. Emprapa, Brasília, DF, Brazil, 2015.

REIS, A. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 426-428, 2005.

SEPÚLVEDA-CHAVERA, G. et al. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomatoes in the Azapa Valley of Chile. **Plant Disease**, v. 98, p. 1432, 2014.

STRAVATO, V. M.; BUONAURO, R.; CAPPELLI, C. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 on tomato in Italy. **Plant Disease**, v. 83, p. 967. 1999.

TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Wr) Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, v. 23, p. 195–209, 1966.

VALENZUELA-URETA, J. G. et al. First report of Fusarium wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in México. **Plant Disease**, v. 80, p.150, 1996.

VOLIN, R. B.; JONES, J. P. A new race of Fusarium wilt of tomato in Florida and sources of resistance. **Proceedings of Florida State Horticultural Society**, v. 95, p. 268–270, 1982.