



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CAMPUS II - AREIA - PB
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

OTÍLIA RICARDO DE FARIAS

***Fusarium* spp. ASSOCIADO A SEMENTES DE GIRASSOL**

AREIA

2020

OTÍLIA RICARDO DE FARIAS

***Fusarium* spp. ASSOCIADO A SEMENTES DE GIRASSOL**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutor(a) em Agronomia**, área de concentração Agricultura Tropical.

Orientadora:

Profa. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento

AREIA

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F224f Farias, Otilia Ricardo de.

Fusarium spp. associado a sementes de girassol / Otilia Ricardo de Farias. - Areia:UFPB/CCA, 2020.
114 f. : il.

Orientação: Luciana Cordeiro do Nascimento.
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Helianthus annuus L. 3. Patologia de sementes. 4. Biologia molecular. 5. Morfologia. 6. Controle biológico. I. Nascimento, Luciana Cordeiro do. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.2)

OTÍLIA RICARDO DE FARIAS

TÍTULO: *Fusarium* spp. ASSOCIADO A SEMENTES DE GIRASSOL

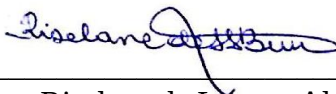
Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, como parte dos requisitos para obtenção do título de **Doutor(a) em Agronomia**, área de concentração Agricultura Tropical.

APROVADO EM: 11/12/ 2020

BANCA EXAMINADORA



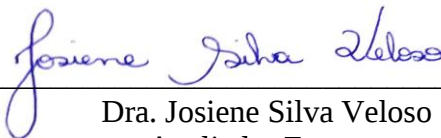
Prof. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento
Orientadora
PPGA/ CCA/ UFPB



Prof. Dra. Riselane de Lucena Alcântara Bruno
Avaliador Interno
PPGA/CCA



Prof. Dra. Mônica Danielly de Mello Oliveira
Avaliador Interno
PPGA/CCA



Dra. Josiene Silva Veloso
Avaliador Externo
UFRPE



Prof. Dra. Kamila Câmara Correia
Avaliador Externo
UFCA

AREIA

2020

Com amor, aos meus pais, **Antônio Ricardo Alcântara** (*in memoriam*) e **Maria do Socorro Cunha Farias**, a minha filha, **Luiza Antônia Farias Cruz**, meu esposo, **José Manoel Ferreira de Lima Cruz**, meu irmão, **Yago Ricardo de Farias**, minha cunhada/amiga/irmão, **Francikelly Almeida** e meu sobrinho **Ygor Ricardo de Almeida**.

Dedico!

AGRADECIMENTO

A **Deus**, pelo dom da vida, por todas as vitórias, por estar presente em minha vida, me guiando, iluminando e dando forças para lutar pelos meus objetivos e me dando ânimo nas situações difíceis.

Aos meus amados pais, **Antônio Ricardo de Alcântara** (*in memoriam*) e **Maria do Socorro Cunha Farias**, que além de todo amor e dedicação na minha criação, me ofereceram a oportunidade de estudar, estando sempre presente com os melhores conselhos, apoio e incentivo. Por sempre compreender meus momentos de faltas no decorrer da minha jornada na pós-graduação e sempre acreditar na minha capacidade, fator fundamental que não me fez desistir em momentos de dificuldade. Por todas as vezes que se doaram sem exigir nada em troca, renunciando aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. Pela educação, onde sempre me ensinaram agir com respeito, simplicidade, honestidade, paciência e amor ao próximo. Dedicação, compreensão, bondade e generosidade são características que sempre definiu perfeitamente vocês. Minha eterna gratidão!

A minha amada filha, **Luiza Antônia Farias**, que pelo simples fato de existir me fez amadurecer diante de inúmeras situações, acreditar na minha capacidade e jamais desistir dos meus objetivos. Você trouxe mais alegria, amor e beleza para minha vida.

Ao meu amado esposo, **José Manoel Ferreira de Lima Cruz**, pelo companheirismo, carinho, cuidado, amor e pela família contruída. Você deixou tudo mais fácil, alegre e prazeroso. Também queria agradecer pela colaboração na realização desse trabalho, sendo sempre tão paciente, dedicado e generoso comigo. Obrigada!

A toda minha família, que sempre me apoiaram e acreditaram em mim e que forma direta ou indireta contribuíram para minha formação profissional. Quero agradecer em especial a minha amada avó **Luiza Cunha**, meu irmão, **Yago Ricardo de Farias**, minha cunhada, **Francikely Almeida** e meu tio **Paulo Sergio Cunha Farias** pelo amor, conselhos, apoio, incentivo, minha eterna gratidão.

À Prof. Dra. **Luciana Cordeiro do Nascimento**, pela orientação, oportunidade, confiança, paciência e valiosos ensinamentos transmitidos no decorrer da pós-graduação, minha eterna gratidão.

A Dra. **Riselane de Lucena Alcântara Bruno**, Dra. **Mônica Danielly de Mello Oliveira**, Dra. **Josiene Silva Veloso** e Dra. **Kamila Câmara Correia** pela participação na banca examinadora e valiosas contribuições.

A minha amiga **Ingrid Gomes Duarte**, pela amizade, cuidado, companheirismo, apoio nos momentos difíceis e pela colaboração na realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A Dra. **Josiene Silva Veloso**, pela paciência, amizade, compreensão, por todo conhecimento transmitido e pela colaboração na realização desse trabalho, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos, **Hiago Antônio**, **Maria Luiza**, **Judi Meire** e **Janailma**, pela amizade, incentivo, apoio, companheirismo e diversos momentos agradáveis.

A todos os professores do PPGAgro/UFPB, em especial a professora **Luciana Cordeiro do Nascimento**, **Riselane de Lucena Alcântara Bruno**, **Edna Ursulino Alves**, **Silvanda de Melo Silva**, pela amizade, incentivo e ensinamentos transmitidos ao longo da pós-graduação, fundamentais para minha formação acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia, em especial **José Manoel**, **João Victor**, **Felipe Marinho** e **Hilderlande**, que ajudaram com tanta disposição na instalação, condução e/ou avaliação desse trabalho, pela troca de experiência e momentos de descontração.

Aos colegas de turma, em especial, **Assys**, **Achilles**, **Joana**, **Dani** e **Bruna**, pela convência agradável, trocas de experiência e momentos de descontração, muito obrigada.

À **Universidade Federal da Paraíba** e ao **Programa de Pós-Graduação em Agronomia** pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao **Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq**, pela concessão da bolsa de estudo.

A **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Algodão**, por disponibilizar as sementes utilizadas nesse trabalho, permitindo a realização do mesmo. Obrigada pela ajuda.

Aos pesquisadores do Laboratório de Virologia e Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Escola de Ciências e Tecnologia pertencente à Universidade de Évora, em especial a Dra. **Maria do Rosário Félix** e Dra. **Carla Varanda**, pela parceria formada e colaboração na realização desse trabalho.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para concretização desta importante etapa da minha vida.

Muito Obrigada!

Os sonhos não determinam o lugar aonde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão. Sonhem com as estrelas para que vocês possam pisar pelo menos na lua. Sonhem com a lua para que vocês possam pisar pelo menos nos altos montes. Sonhem com os altos montes para que vocês possam ter dignidade quando atravessarem os vales das perdas e das frustrações. Bons alunos aprendem a matemática numérica, alunos fascinantes vão além, aprendem a matemática da emoção, que não tem conta exata e que rompe a regra da lógica. Nessa matemática você só aprende a multiplicar quando aprende a dividir, só consegue ganhar quando aprende a perder, só consegue receber, quando aprende a se doar.

Augusto Cury

RESUMO GERAL

A murcha, ocasionada por *Fusarium* spp., constitui uma ameaça a produção do girassol. A correta identificação e adoção de medidas de controle são fundamentais para evitar os danos ocasionados por esse patógeno. O manejo dessa doença pode ser realizado através de medidas preventivas, como a microbiolização das sementes com *Trichoderma* spp. Objetivou-se com esta pesquisa realizar a caracterização molecular e morfológica, a transmissão e o controle biológico de *Fusarium* spp. associado a sementes de girassol. Um total de 50 isolados de *Fusarium* spp. foi obtido a partir de amostras de sementes de oito cultivares de girassol. A caracterização molecular dos isolados de *Fusarium* spp. foi realizada utilizando-se sequências do gene fator de alongação (*tef1*) e o gene β -tubulina 2 (*tub2*). Na caracterização morfológica avaliou-se a pigmentação da colônia; presença ou ausência de esporodóquios; tamanho, formato e septação de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides (monofiálide e/ou polifiálide); presença ou ausência de clamidósporos; microconídios em falsas cabeças e/ou cadeia; crescimento micelial; índice de velocidade de crescimento micelial e produção de conídios. Também foi determinada a prevalência das espécies de *Fusarium* spp. por cultivar e a patogenicidade dos isolados. Na transmissão contabilizou-se a porcentagem de plântulas emersas, sementes não germinadas com e sem *Fusarium* spp., plântulas sintomáticas e assintomáticas, taxa de transmissão e incidência de doença. Para controle, foram selecionados sete isolados de *Trichoderma* sp. (TCH01, TCH02, TCH03, TCH04, TCH05, TCH06 e TCH07) no antagonismo a *F. proliferatum* (F32). Os isolados foram confrontados *in vitro* com o patógeno em testes de cultura pareada, antibiose e micoparasitismo. A sanidade das sementes inoculadas com o patógeno e tratadas com o antagonista foi avaliada pelo método “*blotter test*”. Também avaliou-se a germinação e emergência após a microbiolização das sementes. Em casa de vegetação, determinou-se a incidência, severidade, comprimento da parte aérea, número de folhas, massa fresca e seca da parte aérea e raízes e a atividade das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (FAL). Nos experimentos adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). O sequenciamento do DNA permitiu identificar *F. fabacearum*, *F. pseudocircinatum*, *F. verticilliioides* e *F. proliferatum* associados a sementes de girassol. Observou-se uma ampla variabilidade morfológica entre os isolados, principalmente com relação a pigmentação da colônia, crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial e produção de conídios. *F. proliferatum* foi a espécie mais prevalente nas diferentes cultivares de girassol. No teste de patogenicidade, verificou-se que todas as espécies foram patogênicas ao girassol. Todos os isolados das quatro espécies foram transmitidos via sementes e causaram sintomas como apodrecimento de sementes na fase de germinação, além de podridão do colo e raízes, tombamento, escurecimento vascular, subdesenvolvimento e podridão das folhas cotiledonares pós-emergência. Observou-se produção de metabólitos voláteis e micoparasitismo direto dos isolados de *Trichoderma* sp. sobre *F. proliferatum*, sendo o primeiro eficiente na redução da incidência e severidade da murcha, na promoção do crescimento e no aumento da atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia liase em plantas de girassol via microbiolização das sementes.

PALAVRAS-CHAVE: *Helianthus annuus* L.. Patologia de sementes. Biologia molecular. Morfologia. Controle biológico.

FARIAS, O. R. *Fusarium* spp. associated with sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.). 114p. Universidade Federal da Paraíba (Thesis Master in Agronomy), Areia, PB. 2020.

GENERAL ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium* sp., is a threat to sunflower production. Correct identification and use of control methods are essential to avoid damages caused by this pathogen. The management of this disease can be carried out through preventive measures, such as the microbiolization of seeds with *Trichoderma* spp. The aim of the present work was to characterize *Fusarium* spp. associated with sunflower seeds by morphological and molecular methods, and the pathogenicity and biological control of *Fusarium* spp. Fifty isolates of *Fusarium* spp. were obtained from seed samples of eight sunflower cultivars. Molecular characterization of *Fusarium* spp. was done by sequencing of the elongation factor (tef1) gene and the β -tubulin 2 (tub2) gene. Morphological characterization of the colony pigmentation was based on the presence or absence of sporodochia; size, shape and segregation of microconidia and macroconidia; types of phialides (single-phial and / or polyphylid); presence or absence of chlamydospores; microconidia and their arrangement in chains or false heads; mycelial growth; mycelial growth rate index and conidia production. The prevalence of *Fusarium* spp. species was also determined. by cultivar and the pathogenicity of the isolates. In transmission, the percentage of emerged seedlings, non-germinated seeds with and without *Fusarium* spp., symptomatic and asymptomatic seedlings, transmission rate and disease incidence were counted. For control, seven isolates of *Trichoderma* sp. (TCH01, TCH02, TCH03, TCH04, TCH05, TCH06 and TCH07) was used in antagonism to *F. proliferatum* (F32). The isolates were compared with the pathogen in vitro tests of paired culture, antibiosis and mycoparasitism. The blotter test was conducted to evaluated seed health of inoculated seeds, with a pathogen and treated with antagonism. Germination and emergence after seed microbiolization was also evaluated. In the greenhouse, the incidence, severity, length of the aerial part, number of leaves, fresh and dry mass of the aerial part and roots and the activity of the enzymes peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (FAL). The experimental design was completely randomized.. DNA sequencing allowed the identification of *F. fabacearum*, *F. pseudocircinatum*, *F. verticillioides* and *F. proliferatum* associated with sunflower seeds. Colony morphology, mycelial growth, mycelial growth rate index and conidia production showed wide variability between the isolates. Among the sunflowers cultivars tested, *F. proliferatum* was the most prevalent species. Pathogenicity test, showed that all species of *Fusarium* spp. founded were pathogenic to sunflower. All isolates of the four species were transmitted via seeds. All the isolates caused symptoms such as rotting of seeds in the germination phase, in addition to rot of the neck and roots, tipping, vascular darkening, underdevelopment and rot of cotyledonous leaves after emergence. Volatile metabolites and direct mycoparasitism were observed in isolates of *Trichoderma* sp. on *F. proliferatum*. *Trichoderma* sp. efficiently reduce incidence and severity of wilt by promoting growth and in increasing the activity of the enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in sunflower plants via seed microbiolization.

KEYWORDS: *Helianthus annuus* L.. Seed pathology. Molecular biology. Morphology. Biological control.

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1.	Isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de sementes infectadas de oito cultivares de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	51
Tabela 2.	Caracteres morfológicos dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. obtidos de sementes infectadas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	58
Tabela 3.	Porcentagem de emergência (E), plântulas não emersas (NE), sementes não germinadas com <i>Fusarium</i> spp. (NCF), sementes não germinadas sem <i>Fusarium</i> spp. (NSF), plântulas sintomáticas (PS), plântulas assintomáticas, taxa de transmissão (TT) e incidência total de doença (IT) no teste de transmissão de 50 isolados de <i>Fusarium</i> spp. em sementes de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	65
Tabela 4.	Contribuição das variáveis em cada eixo dos componentes principais nas variações dos índices de emergência de plântulas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) infectadas por <i>Fusarium</i> spp.....	67

Capítulo III

Tabela 1.	Origem dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.....	82
Tabela 2.	Escala de classificação de <i>Trichoderma</i> sp. proposta por Bell et al. (1982).....	83
Tabela 3.	Controle biológico com <i>Trichoderma</i> sp. utilizados em sementes de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) previamente inoculadas com <i>Fusarium proliferatum</i>	85
Tabela 4.	Controle biológico com <i>Trichoderma</i> sp. utilizado em sementes de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.).....	89
Tabela 5.	Classificação dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp. quanto ao antagonismo exercido sobre <i>Fusarium proliferatum</i>	92
Tabela 6.	Ação dos metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> sp. sobre o crescimento micelial (CM), índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), taxa de crescimento micelial (TX) e número de esporos de <i>Fusarium proliferatum</i>	95
Tabela 7.	Primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), primeira contagem de emergência (PCE), emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.), cultivar BRS 324, inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp.....	98
Tabela 8.	Comprimento da parte aérea nos testes de germinação (CPG) e emergência (CPE) e massa seca da parte aérea nos testes de germinação (MSPG) e emergência (MSPE) de sementes e plântulas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.), cultivar BRS 324, inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp.....	99

Tabela 9.	Comprimento de raízes nos testes de germinação (CRG) e emergência (CRE) e massa seca de raízes nos testes de germinação (MSRG) e emergência (MSRE), de sementes e plântulas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.), cultivar BRS 324, inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp.....	100
Tabela 10.	Presença (+) e ausência (-) de <i>Trichoderma</i> spp. em diferentes partes de plântulas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.), detectadas pelo teste de colonização endofítica.....	102
Tabela 11.	Incidência (%), severidade e índice de severidade de doença (ISD - %) da murcha de fusário em plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.), cultivar BRS 324, aos 57 DAS, inoculadas com diferentes isolados de <i>Trichoderma</i> sp.....	103
Tabela 12.	Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raízes (MFRA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSRA) de plantas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.), cultivar BRS 324, aos 57 DAS, inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp.....	105

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo II

- Figura 1.** Árvore de probabilidade máxima do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* inferida a partir de um alinhamento concatenado de tef1 e TUB2. Os valores de suporte de bootstrap ($MV \geq 70$) e os valores de probabilidade posterior bayesiana ($PP \geq 0.95$) são mostrados nos nós. "-" indica suporte não significativo. Ex-tipos são enfatizados em negrito. "*" Indica isolados de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). A árvore está enraizada pelo *midpoint*. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 53
- Figura 2.** Árvore de probabilidade máxima do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* inferida a partir de um alinhamento concatenado de tef1 e TUB2. Os valores de suporte de bootstrap ($MV \geq 70$) e os valores de probabilidade posterior bayesiana ($PP \geq 0.95$) são mostrados nos nós. "-" indica suporte não significativo. Ex-tipos são enfatizados em negrito. "*" Indica isolados de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). A árvore está enraizada pelo *midpoint*. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site..... 54
- Figura 3.** Coloração das colônias dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes infectadas de girassol (*Helianthus annuus* L.). crescidos em meio BDA. F4: *F. pseudocircinatum*; F5 e F6: *F. fabacearum*; F11, F12, F13, F18, F20, F21, F22, F23, F24 e F28: *F. verticilliioides*; F29, F30, F36, F38, F39, F46 e F48: *F. proliferatum*..... 59
- Figura 4.** Características morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes infectadas de girassol (*Helianthus annuus* L.). A. Macroconídio de *F. pseudocircinatum*; B. Macroconídio de *F. fabacearum*; C. Macroconídio de *F. verticilliioides*; D. Macroconídio de *F. verticilliioides*; E. Macroconídio de *F. proliferatum*; F. Hifas estéreis enroladas em *F. pseudocircinatum*; G. Conidióforo em polifialíde; H. Monofialídes longos com falsa cabeça; I. Monofialídes curtos com falsa cabeça; J. Clamidósporo verrucoso único na ponta das hifas (terminal); K. Clamidósporo verrucoso único e; L. Clamidósporos intercalar ou em cadeias. (Barra de escala = 20 μ m)..... 60
- Figura 5.** Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), crescimento micelial (CM) e produção de conídios (PC) de isolados de *Fusarium* spp. em de sementes infectadas de girassol (*Helianthus annuus* L.). F4: *F. pseudocircinatum*; F5 e F6: *F. fabacearum*; F11, F12, F13, F18, F20, F21, F22, F23, F24 e F28: *F. verticilliioides*; F29, F30, F36, F38, F39, F46 e F48: *F. proliferatum*..... 61
- Figura 6.** Prevalência de espécies de *Fusarium* spp. associadas a sementes de diferentes cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.)..... 62

Figura 7.	Sintomas de <i>Fusarium</i> spp. em sementes e plântulas de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.). A. Sementes deterioradas e com crescimento fúngico; B. Plântula com podridão no hipocótilo e crescimento fúngico; C. Sementes e plântulas necrosadas; D. Corte longitudinal do caule com escurecimento vascular; E. Subdesenvolvimento de plântula; F. Podridão de folhas cotiledonares; G. Incidência da doença e virulência das quatro espécies de <i>Fusarium</i>	63
Figura 8.	Análise de componentes principais (ACP) dos isolados de <i>Fusarium</i> spp. agrupados em diferentes níveis de patogenicidade em relação aos índices de germinação. As elipses vermelhas, azul, verde, e laranja representam a distância euclidiana do centroide no intervalo de confiança ($p < 0.05$). E = emergência, NE = sementes não emergidas, NCF = sementes não emergidas com <i>Fusarium</i> spp., NSF = sementes não emergidas sem <i>Fusarium</i> spp., RE = redução de emergência, PS = plântulas sintomáticas, PA = plântulas assintomáticas, TT = taxa de transmissão e IT = incidência total de doença.....	68
Figura 9.	Matriz de correlação entre as variáveis de germinação em sementes de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) infectadas por <i>Fusarium</i> spp.....	70

Capítulo III

Figura 1.	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. contra <i>Fusarium proliferatum</i> após o teste de confronto direto. A: Crescimento micelial rápido e esporulação densa de <i>F. proliferatum</i> ; B: <i>Trichoderma</i> sp. crescendo sobre o patógeno e ocupando toda a superfície do meio; C: <i>Trichoderma</i> sp. crescendo sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio.....	93
Figura 2.	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. contra <i>Fusarium proliferatum</i> após o teste de confronto direto. A: Hifas saudáveis de <i>Fusarium proliferatum</i> ; B: Vacuolização/ruptura celular; C: Enrolamento/estrangulamento de hifas.....	94
Tabela 3.	A. Crescimento micelial de <i>Fusarium proliferatum</i> após ação dos metabólitos voláteis produzidos por <i>Trichoderma</i> sp.; B. Efeito inibidor de metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> sp. sobre porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e inibição da esporulação (PIE) de <i>Fusarium proliferatum</i> . Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). T1 – Controle; T2 – TCH01 (<i>Trichoderma asperellum</i> isolado de Trichodel [®]); T3 - TCH02; T4 - TCH03; T5 – TCH04; T6 – TCH05; T7 –TCH06; T8 –TCH07.....	96
Figura 4.	Incidência de <i>Fusarium proliferatum</i> em sementes de girassol (<i>Helianthus annuus</i> L.) microbiolizadas com <i>Trichoderma</i> sp.. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). Concentração da suspensão dos isolados de <i>Trichoderma</i> sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL ⁻¹ ; Fungicida: 240g/100 kg de sementes.....	97

- Figura 5.** Crescimento inicial de plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), cv BRS 324, nos testes de germinação (A) e emergência (B), inoculadas com *Trichoderma* sp.. T1 – Controle (composta pelas sementes imersas em ADE); T2 – Inoculação com TCH01 (sementes inoculadas com *Trichoderma asperellum* isolado de Trichodel[®]); T3 - Inoculação com TCH02; T4 - Inoculação com TCH03; T5 – Inoculação com TCH04; T6 – Inoculação com TCH05; T7 – Inoculação com TCH06; T8 – Inoculação com TCH07; T9 - Tratamento com fungicida Captana. Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida: 240g/100 kg de sementes..... 101
- Figura 6.** Atividade da Fenilalanina amônia-liase em girassol (*Helianthus annuus* L.), cv. BRS 324, inoculadas com *F. proliferatum* e tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. via sementes. Diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes)..... 106
- Figura 7.** Atividade da Peroxidase em girassol (*Helianthus annuus* L.), cv. BRS 324, inoculadas com *F. proliferatum* e tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. via sementes. Diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes)..... 107
- Figura 8.** Atividade da Polifenoloxidase em girassol (*Helianthus annuus* L.), cv. BRS 324, inoculadas com *F. proliferatum* e tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. via sementes. Diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes)..... 108

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – *Fusarium* spp. ASSOCIADO A SEMENTES DE GIRASSOL.....17

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	17
2. OBJETIVO.....	19
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivo Específico.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 Importância da cultura do girassol.....	20
3.2. Qualidade sanitária de sementes de girassol.....	21
3.3. <i>Fusarium</i> spp. associado a sementes de girassol.....	24
3.4. Identificação de <i>Fusarium</i> spp.....	26
3.5. Controle biológico de <i>Fusarium</i> spp. associado à sementes.....	29
REFERÊNCIAS.....	33

CAPÍTULO II - ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A SEMENTES DE GIRASSOL: CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E TRANSMISSÃO.....41

1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1. Localização experimental.....	45
2.2. Obtenção e preservação dos isolados de <i>Fusarium</i> sp.....	45
2.3. Análise filogenética.....	46
2.3.1. Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA.....	46
2.3.2. Alinhamento de sequências e análises filogenéticas.....	46
2.4. Caracterização morfológica dos isolados.....	47
2.5. Prevalência de espécies de <i>Fusarium</i> spp. por cultivar.....	48
2.6. Transmissão semente-plântula de <i>Fusarium</i> spp.....	49
2.7. Delineamento experimental e análise estatística.....	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
3.1. Amostragem e isolamento.....	51
3.2. Análise filogenética.....	51
3.3. Caracterização morfológica dos isolados.....	56
3.4. Prevalência de espécies de <i>Fusarium</i> spp. por cultivar.....	61

3.5. Transmissão semente-plântula de <i>Fusarium</i> spp.....	62
4. CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS.....	73

CAPÍTULO III - MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE GIRASSOL COM *Trichoderma* sp. PARA CONTROLE DE *Fusarium proliferatum*.....78

1. INTRODUÇÃO.....	80
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	82
2.1. Localização experimental.....	82
2.2. Obtenção e identificação de <i>Trichoderma</i> sp.....	82
2.3. Obtenção e identificação do isolado de <i>Fusarium proliferatum</i>	82
2.4. Origem das sementes de girassol.....	83
2.5. Controle <i>in vitro</i> de <i>Fusarium proliferatum</i> com <i>Trichoderma</i> sp.....	83
2.5.1. Teste de pareamento de culturas.....	83
2.5.2. Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium proliferatum</i>	84
2.5.3. Metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium proliferatum</i>	84
2.6. Controle de <i>F. proliferatum</i> em sementes microbiolizadas.....	85
2.7. Germinação e emergência em sementes de girassol microbiolizadas.....	86
2.7.1. Teste de germinação.....	86
2.7.2. Teste de emergência.....	87
2.8. Teste de colonização endofítica.....	88
2.9. Manejo da murcha vascular causada por <i>F. proliferatum</i> através microbiolização sementes.....	88
2.10. Atividade enzimática induzida por <i>Trichoderma</i> sp. em plantas de girassol.....	90
2.10.1. Atividade da Fenilalanina Amônia-liase (FAL).....	90
2.10.2. Atividade da Peroxidase (POD).....	91
2.10.3. Atividade da Polifenoloxidase (PPO).....	91
2.11. Delineamento experimental e análise estatística.....	91
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
3.1. Controle <i>in vitro</i> de <i>Fusarium proliferatum</i> com <i>Trichoderma</i> sp.....	92
3.1.1. Teste de pareamento de culturas.....	92
3.1.2. Micoparasitismo de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium proliferatum</i>	94
3.1.3. Metabólitos voláteis de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium proliferatum</i>	94

3.2. Controle de <i>F. proliferatum</i> em sementes microbiolizadas.....	97
3.3. Germinação e emergência em sementes de girassol microbiolizadas.....	98
3.4. Teste de colonização endofítica.....	102
3.5. Manejo da murcha vascular causada por <i>F. proliferatum</i> através microbiolização sementes.....	103
3.6. Atividade enzimática induzida por <i>Trichoderma</i> sp. em plantas de girassol.....	105
4. CONCLUSÃO.....	109
REFERÊNCIAS.....	110

CAPÍTULO I

Fusarium spp. ASSOCIADO A SEMENTES DE GIRASSOL

1. INTRODUÇÃO GERAL

O girassol é a quarta maior cultura produtora de óleo comestível no mundo, ficando atrás da soja (*Glycine max* L. Merrill), colza (*Brassica napus* L.) e amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e seu óleo vegetal é o segundo mais consumido no Brasil (NUNES et al., 2013). No Brasil, os estados do Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e Rio Grande do Sul são os principais produtores, responsáveis por uma produção de 39,4; 31,4; 2,6 e 1,5 mil toneladas, respectivamente, totalizando 74,9 mil toneladas (CONAB, 2020).

A qualidade sanitária de sementes desperta grande interesse dos produtores, devido os danos ocasionados pelos patógenos associados às mesmas, já que aproximadamente 90% das culturas de importância agrícola são propagadas por sementes (HENNING et al., 2005; CATÃO et al., 2016). Assim, as sementes constituem, para maioria dos fitopatógenos, um meio eficiente de sobrevivência e disseminação e, conseqüentemente, introdução de doenças em novas áreas (SILVA FLÁVIO et al., 2014; CHALAM et al., 2020).

Vários danos podem ser provocados por patógenos associados às sementes, tais como apodrecimento ou tombamento de plântulas (damping-off), emergência desuniforme, podridão de raízes e colo, clorose, deformação, subdesenvolvimento e murcha, que podem comprometer toda a produção. Com isso, o uso de sementes com qualidade sanitária torna-se imprescindível no momento da implantação da cultura (MUKHTAH, 2009; ADDRAH et al., 2020).

A ocorrência de determinados patógenos nas sementes, mesmo em taxas relativamente baixas, pode resultar em perdas quantitativas e qualitativas na produção, como é o caso de *Fusarium* spp. (SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2006; GOMES et al., 2006; SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2007; CATÃO et al., 2016; IRSHAD et al., 2017; ADDRAH et al., 2020). Este patógeno causa murcha, e caracteriza-se, em geral, pelo apodrecimento de sementes e do sistema radicular, escurecimento de raízes, amarelecimento e murcha de folhas e morte das plantas infectadas (KEERIO et al., 2017).

Devido a alta variabilidade morfológica em *Fusarium* spp., técnicas moleculares se tornaram uma importante ferramenta para identificação de espécies de forma mais precisa e complementada com os testes de patogenicidade e caracterização morfológica

(KOYYAPPURATH et al., 2016). Sendo esta realizada através da amplificação e análise de sequências de DNA de genes selecionados, fornecendo informações sobre a variabilidade e relações evolutivas desse patógeno (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Dentre os métodos de tratamento de sementes para controle de fungos pode-se citar o uso frequente de fungicidas, no entanto, esses produtos podem trazer impactos negativos ao meio ambiente, saúde dos agricultores e contaminação da cadeia alimentar (BORDAT et al., 2017), possuir alto custos e ter a perda de eficiência (KAWUBE et al., 2005), e surgimento de resistência dos organismos-alvo (PATEL; JASRAI, 2015) devido ao uso frequente e inadequado, além disso, a falta de especificidade ao patógeno, pode eliminar microrganismos benéficos à planta. Diante de todos esses entraves, o incentivo a diversas pesquisas com a utilização de produtos alternativos tem crescido nos últimos anos, como o uso de controle biológico, destacando-se fungos do gênero *Trichoderma* spp. no tratamento de sementes (LAZAROTTO et al., 2013).

Além do controle de patógenos, a influência de formulados a base de microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas é ampla, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas, crescimento e produtividade das culturas agrícolas (CHAGAS et al., 2017), devido à secreção de fitormônios, permitindo uma melhor assimilação de água e nutrientes e consequentemente favorecendo um maior desenvolvimento das plantas inoculadas (CARVALHO et al., 2011).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar molecular e morfológicamente as espécies *Fusarium* associadas às sementes de girassol, bem como determinar as taxas de transmissão dessas espécies e verificar a ação biocontroladora *Trichoderma* spp. no manejo da murcha de fusário no girassol.

2.2. Objetivos específicos

Realizar a caracterização molecular, morfológica e patogênica de isolados de *Fusarium* spp. associados às sementes de girassol;

Determinar o nível de transmissão de *Fusarium* spp. via semente-plântula de girassol;

Analisar a influência do *Fusarium* spp. na emergência de plântulas de girassol;

Determinar a atividade *in vitro* de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium proliferatum*;

Verificar a influência dos isolados de *Trichoderma* sp. na germinação das sementes, emergência das plântulas e na promoção do crescimento e colonização do sistema radicular das plantas de girassol através da microbiolização sementes;

Avaliar a incidência e severidade da murcha vascular e indução de resistência em plantas de girassol tratadas com isolados de *Trichoderma* sp. através da inoculação via sementes;

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Importância da cultura do girassol

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma cultura originária da América do Norte, pertencente à família Asteraceae e é uma das 67 espécies no gênero *Helianthus*. Pesquisas sugerem que girassol foi domesticado antes do milho (*Zea mays* L.) pelos índios americanos entre 4.500 e 3.000 anos atrás, sendo utilizada com propósito de alimentação, medicinal e ornamental (DIAMOND, 1999).

No Brasil, o cultivo do girassol iniciou no século XIX, na região Sul (PELEGRINI, 1985). Em 1902, em São Paulo, iniciou-se o primeiro cultivo comercial dessa cultura, após a Secretaria da Agricultura distribuir sementes para os agricultores do estado (UNGARO, 1982).

A falta de adaptação das cultivares e a competição por outras culturas mais atrativas, como soja (*Glycine max* L. Merrill), milho (*Zea mays* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.), aliados aos prejuízos ocasionados pela ferrugem, falta de informações sobre correção de solo, de tecnologia adaptada às condições brasileiras, baixo teor de óleo dos materiais genéticos utilizados nos plantios brasileiros e falta de mercado, resultou no insucesso do plantio do girassol em São Paulo, que teve área de 5.324 ha em 1966/67 reduzida para menos da metade (1.500 ha) em 1972/73 (LASCA, 1993).

No entanto, o cenário mudou e essa cultura passou a ter grande importância para o Brasil e o mundo. Atualmente, o girassol é uma das principais culturas oleaginosas cultivadas (ZHANG et al., 2018), e cada vez mais esta assumindo uma posição privilegiada na economia de oleaginosas, tanto a nível nacional quanto global e seu óleo vegetal é o segundo mais consumido no Brasil (NUNES et al., 2013). É uma planta de múltiplos usos e amplo aproveitamento, podendo ser utilizada na produção de biodiesel, óleo comestível, silagem, farelo, mel, alimento para pássaros, cosméticos, medicamentos e, também, como planta ornamental (CATÃO et al., 2016; LUSTRI et al., 2017).

Em escala global, é a quarta em produção de grãos e óleo (RAUF et al., 2017), tendo a Ucrânia e Rússia como os maiores produtores, com uma produção de 16,5 e 15,3 milhões de toneladas na safra 2019/2020, o que corresponde mais de 50% do total do mundo. Além de ser o principal produtor mundial, a Ucrânia também é o maior exportador de óleo de girassol (STATISTA, 2020).

No Brasil, segundo levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) na safra 2019/2020 o cultivo do girassol ocupou 47,1 mil ha de áreas plantadas, obteve uma produtividade de 1.590 kg/ha e uma produção de 74,9 mil toneladas. Os principais estados produtores foram Mato Grosso, Goiás, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, e Minas Gerais, responsáveis por uma produção de 38,0; 32,9; 2,3; 1,5 e 0,2 mil toneladas, respectivamente. Na Região Centro-Oeste, essa cultura é utilizada amplamente tanto para extração do óleo, como na alimentação animal e humana (CONAB, 2020).

As sementes de girassol contêm em torno de 40% de óleo comestível e 23% de proteínas e são fonte de fibras, vitamina E, vitaminas do complexo B, cobre e zinco (ADDRAH et al., 2020). O óleo é considerado de boa qualidade devido à alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados (55 a 60% de ácido linoleico, 25 a 30% de ácido oleico), que são conhecidos por reduzir o risco de doença coronariana, reduzindo o colesterol no plasma sanguíneo (YAMGAR et al., 2018).

Essa cultura apresenta características agrônômicas importantes, como crescimento rápido, elevada qualidade e bom rendimento de óleo, tolerância à temperaturas baixas e ao calor e resistência a déficit hídrico (DANTAS et al., 2015; CATÃO et al., 2016). Apresenta ampla adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas e seu rendimento é pouco influenciado pela latitude, pela altitude e pelo fotoperíodo (GOMES et al., 2006)

3.2. Qualidade sanitária de sementes de girassol

A qualidade das sementes é expressa pelos atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários (PESKE et al., 2012). A qualidade sanitária é avaliada pela presença ou ausência de infestação por insetos e/ou infecção de patógenos (GAUR et al., 2020).

Para atender a demanda de alimentos e as necessidades nutricionais básicas da crescente população do mundo é necessário aumentar a produção agrícola. E, como a principal forma de propagação da maioria das culturas é via sementes, a qualidade das mesmas é um fator preponderante para o sucesso dos plantios (CATÃO et al., 2016).

De acordo com Gomes et al. (2008) a ocorrência de doenças causadas por vírus, bactérias e fungos é considerada como um dos principais entraves para expansão dessa cultura, pois a mesma é hospedeira de mais de 35 organismos fitopatogênicos, sendo a maioria fungos e transmitidos através de sementes. Catão et al. (2016) afirmam que o conhecimento dos padrões de qualidade das sementes antes da semeadura é o procedimento mais correto e seguro para evitar aumento no custo de produção da cultura.

Uma série de patógenos fúngicos transmitidos por sementes afetam negativamente o cultivo e a produção de sementes de girassol. As sementes são afetadas principalmente durante os estágios iniciais de germinação, resultando em baixa emergência de plântulas (MUKHTAR, 2009). Além disso, podem causar tombamento, podridão radicular, mancha foliar ou podridão do caule em plantas adultas, causando grandes perdas econômicas (ADDRAH et al., 2020).

As sementes constituem em um dos principais insumos agrícolas e as mesmas devem apresentar boa qualidade e ser livres de patógenos, sendo este um dos pré-requisitos mais importante para uma boa produção agrícola, fundamental para obtenção de estandes de plantas uniformes, vigorosas e livres de doenças (GOMES et al. 2008).

O inóculo presente nas sementes é facilmente disseminado e introduzido em áreas isentas, podendo determinar o ciclo inicial da doença e infestar, de forma definitiva, o campo de cultivo (SILVA FLÁVIO et al., 2014; CHALAM et al., 2020). Com isso, a utilização de sementes com qualidade sanitária constitui-se como um dos principais meio de reduzir a disseminação e introdução de patógenos nos campos de cultivo.

O patógeno nas sementes pode ser transportado e não afetar a germinação ou não ser transmitido pelas sementes, pois o estabelecimento da infecção em mudas/plântulas e em plantas adultas é o elo decisivo no processo de transmissão de um patógeno, sendo este um processo complexo, resultante da interação do patógeno, de saprófitas presentes no solo e lixiviados produzidos pelas sementes (GAUR et al., 2020).

Gomes et al. (2006) ao avaliarem a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de girassol produzidas na região de Timon, Estado do Maranhão, constataram a presença dos gêneros *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Dreschelera* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Rhizoctonia* sp., *Rhizopus* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Trichoderma* sp., e observaram, que no geral, a maioria desses fungos nas sementes não influenciaram a germinação e vigor, e não resultaram em plântulas infectadas.

Sementes são eficientes meios de sobrevivência para os patógenos, uma vez que são propágulos que apresentam maior viabilidade no tempo quando comparados com outras partes vegetais de propagação (MACHADO, 2012). Após 12 meses de armazenamento, Catão et al. (2016) observaram que *Fusarium semitectum*, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. presentes em sementes de girassol permaneceram viáveis e os mesmos comprometeram a qualidade das sementes e o desenvolvimento das plantas após o armazenamento.

Segundo Gaur et al. (2020) os patógenos nas sementes são conhecidos como: 1) Patógenos de origem externa: que estão aderidos na superfície da semente na forma de conídios, micélio ou qualquer outro tipo de esporo em repouso; 2) Patógenos de origem interna: estão presentes em qualquer lugar dentro da semente, seja abaixo do tegumento, endosperma ou junto ao embrião; 3) Contaminantes concomitantes: neste caso o patógeno, separado ou não da semente, encontra-se na forma de propágulos (micélio, escleródios e esporos), dentro de fragmentos vegetais, sementes de plantas daninhas e partículas de solo.

Zhang et al. (2018) ao marcarem com GFP (proteína verde fluorescente) o isolado de *Verticillium dahliae*, agente causal da murcha de verticílio do girassol, observaram que o revestimento das sementes (tegumento) era um dos principais tecidos nos quais o inóculo infestava e se acumulava. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que esse patógeno fica aderido ao tegumento das sementes, por onde é transportado à longas distâncias e posteriormente transmitido.

A alta taxa de contaminação do revestimento das sementes de girassol também foi confirmada por Addrah et al. (2020) ao avaliarem 68 variedades e observaram que apenas 11 (16%) estavam livres de contaminação, enquanto 58 variedades (84%) estavam infectadas. Nessa pesquisa foram identificadas cinco espécies de *Alternaria* spp. (*A. tenuissima*, *A. alternata*, *A. helianthiinficiens*, *A. longipes* e *A. tamaricis*), três de *Fusarium* spp. (*F. oxysporum*, *F. incarnatum* e *F. proliferatum*), além de *V. dahliae* e *Cladosporium cladosporioides*, sendo todos transmitidos pelas sementes.

Os fungos associados às sementes ainda podem ser classificados como de campo e de armazenamento. Durante o processo de maturação, as sementes com elevado teor de água (acima de 20%), sob umidade relativa do ar superior a 95%, fornecem condições favoráveis ao ataque de “fungos de campo”, representados principalmente por fungos dos gêneros *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Macrophomina* sp. e *Sclerotinia* sp., entre outros. Por sua vez, os “fungos de armazenamento”, abordam principalmente os gêneros *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., que geralmente invadem as sementes após a colheita causando deterioração e podridão. Estes requerem uma menor quantidade de água (em torno de 14%) e uma umidade relativa do ar superior a 80% (MARCOS FILHO, 2005).

Gomes et al. (2008) relataram que os principais agentes fúngicos de campo detectados em sementes de girassol foram *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Curvularia* sp. e *Dreschelera* sp. enquanto *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Rhizopus* sp. foram os fungos de armazenamento. Talamini et al. (2011) ao avaliarem a qualidade sanitária das sementes de girassol introduzidas em Sergipe, identificaram *Bipolaris* sp., *A. alternata*, *A. helianthi* e

Fusarium sp., considerados fungos de campo e *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., pertencentes a classe de fungos de armazenamento.

Irshad et al. (2017) identificaram *A. alternata*, *A. flavus*, *A. niger*, *Cladosporium* sp., *Stemphylium helianthi*, *Penicillium* sp., *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Mucor* sp. e *R. solani* associados a sementes de 7 cultivares de girassol, sendo estes responsáveis por 10-30% de redução da germinação das sementes e 10-17% de mortalidade das plântulas.

O sucesso da agricultura moderna depende de sementes isentas de patógenos, altamente produtivas e aliadas a novas tecnologias no tratamento dessas sementes, resultando em controle de patógenos com potenciais epidêmicos.

3.3. *Fusarium* spp. associado a sementes de girassol

Espécies de *Fusarium* spp. são comumente relatadas como endófitas, epífitas, saprófitas e patógenos de várias culturas economicamente importantes, estando distribuídos em todo o mundo, desde as regiões temperadas às tropicais (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A ampla distribuição desse microrganismo pode ser atribuída à sua capacidade de crescer em uma ampla variedade de substratos e seus mecanismos eficientes de disseminação (BURGESS, 1981).

Os sintomas típicos de *Fusarium* spp. em plantas de girassol incluem podridão de sementes e em plantas pode ser observados murcha, clorose, subdesenvolvimento, queda de folhas, tombamento e escurecimento vascular. Os sintomas iniciais são murcha, clorose das folhas jovens e queda das folhas mais velhas e em seguida morte das plantas infectadas. Ao seccionar o caule observa-se o escurecimento dos tecidos vasculares, com lesões marrons (KEERIO et al., 2017).

Fusarium spp. é caracterizado por apresentar macroconídios hialinos, bicelulares, fusiformes a falciformes, principalmente, com células apicais alongadas e células basais pediceladas. Os microconídios são unicelulares, hialinos, piriformes, fusiformes a ovais, retos ou curvos. Os clamidósporos podem estar presentes ou ausentes (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O desenvolvimento da doença causada por *Fusarium* spp. é favorecido quando o plantio é realizado em locais com temperaturas entre 25°C e 30°C, em solos leves, arenosos, alcalinos e úmidos (SINGH et al., 2007), condições ideais para o desenvolvimento da cultura. Os esporos de *Fusarium* spp. são estimulados a germinar através de exsudatos liberados pelas raízes. Uma vez que o contato é feito com hospedeiro, ocorre a formação de micélio, que

penetra o tecido vegetal através de ferimentos ou pontos de formação das raízes laterais, formando assim relações interparasitárias (LESLIE; SUMMERELL, 2006). A penetração é controlada por uma combinação de diferentes fatores que incluem compostos fúngicos, estruturas da superfície da planta, ativadores ou inibidores da germinação de esporos do fungo e formação de tubo germinativo (MENDGEN et al., 1996). O micélio atravessa o córtex da raiz intercelularmente e atinge os vasos do xilema, onde cresce e se multiplica, produzindo macroconídios e microconídios, que são transportados sistemicamente na planta, podendo atingir as sementes (SHARMA et al., 2016). A colonização do sistema vascular impede o transporte de água e nutrientes das raízes para a parte aérea da planta, resultando em sintomas reflexos, como murcha, amarelecimento, queda das folhas até a morte da planta (JENDOUBI et al., 2017).

O murchamento também pode ocorrer devido à produção de toxinas, devido às respostas de defesa do hospedeiro, incluindo produção de géis, gomas e tilos e esmagamento de vasos por proliferação de células do parênquima adjacentes (BECKMAN, 1987).

Na ausência das condições ideais para o desenvolvimento da doença, o fungo sobrevive através de estruturas de resistência conhecida como clamidósporos, ou ainda, em estruturas internas das sementes, como no embrião. No entanto, é necessário que estudos mais aprofundados sejam realizados, para maior conhecimento sobre a sobrevivência deste patógeno nas sementes, como o período para a infecção e o desenvolvimento de métodos eficazes de inoculação (RAMOS et al., 2014). Os conídios têm vida curta, no entanto, os clamidósporos podem permanecer viáveis por muitos anos (CHAND et al., 2009).

O fungo pode ser transmitido por semente e sobreviver em restos de plantas no solo. A ocorrência de *Fusarium* spp. é altamente prejudicial ao girassol (TALAMINI et al., 2011) o mesmo é facilmente disseminado e transmitido por sementes (ADDRAH et al., 2020) podendo ser encontrado no embrião e nos cotilédones (ZHANG et al., 2018). Gomes et al. (2006) observaram que baixos percentuais de vigor em sementes dos genótipos Catissol 01 e Hélio 251 e os baixos índices de plântulas normais dos genótipos Hélio 250 e Nutrissol estavam relacionados com os altos percentuais de sementes de girassol portadoras de *Fusarium* sp..

Apesar dos poucos estudos da associação de *Fusarium* spp. em sementes de girassol, diferentes espécies já foram relatadas sendo transmitidas, via sementes, e causando danos. Trabalhos pioneiros identificaram *F. anthophilum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, e *F. subglutinans*, *F. chlamydosporum* e *F. sporotrichioides* (SHARFUN-NAHAR; MUSHTAQ, 2006) e *F. equiseti*, *F. longipes*, *F. scirpi*, *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum* e *F. solani*

(SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2007) causando danos em diferentes proporções ao serem inoculados nas sementes.

3.4. Identificação de *Fusarium* spp.

O gênero *Fusarium* foi descrito pela primeira vez por Link, um micologista alemão em meados de 1809. Em 1935 esse gênero foi dividido em mais de 1000 indivíduos em 16 secções, divididas em 65 espécies, 55 variedades e 22 *formae speciales*, sendo os mesmos separados através de suas características morfológicas, como tamanho e forma de conídios, ausência ou presença de clamidósporos e crescimento de colônia em diferentes meios de cultura (NELSON, 1991). Atualmente, *Fusarium* pertence a família Nectriaceae, ordem Hypocreales, classe Sordariomycetes, filo Ascomycota e apresenta em torno de 863 espécies e subespécies (INDEX FUGORUM, 2020).

Espécies de *Fusarium* formam um grupo de fungos cosmopolitas e são considerados patógenos extremamente importantes, sendo responsáveis por causarem podridão radicular e murcha em inúmeras culturas, possuem potencial de produção de micotoxinas, substância tóxica em humanos e animais e por apresentarem uma grande variação quanto ao número de espécies, distribuição, hospedeiro e virulência entre as regiões temperadas e tropicais (LESLIE; SUMMERELL 2006; KARLSSON et al., 2016).

O gênero é um fungo típico do solo, onde é encontrado geralmente em abundância e amplamente distribuído pelo mundo. Vários fatores determinam a distribuição e diversidade desse gênero, como as condições climáticas (SUMMERELL et al., 2010), características do solo, tipo de cultura implantada, práticas culturais e atividades humanas (ALABOUVETTE et al., 2009).

A identificação correta de espécies de *Fusarium* é importante para condução de estratégias de controle desse patógeno. O conhecimento da variabilidade das populações é de fundamental importância no conhecimento evolutivo e epidemiológico de determinado patógeno, sendo útil para fornecer informações sobre o potencial de adaptação dos organismos a diferentes genótipos do hospedeiro e preferências climáticas, ciclo de vida, produção de micotoxinas e respostas a fungicidas e outras condições adversas, tendo implicações diretas no manejo da doença (XU; NICHOLSON, 2009).

A identificação de *Fusarium* spp. envolve três conceitos de espécie: conceito de espécie morfológica (*Morphological Species Concept – MSC*), baseados em caracteres morfológicos em comum a um grupo (e diferente nos demais grupos); o conceito da espécie

biológica (*Biological Species Concept* – BSC), baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; e o conceito de espécie filogenética (*Phylogenetic Species Concept* – PSC), baseado na análise de sequências de DNA (O'DONNELL et al., 2000).

A identificação inicial geralmente é realizada através de observações e mensurações das características morfológicas em meios de culturas e temperaturas apropriados, por exemplo, a forma e o tamanho dos conídios, pigmentação e taxa de crescimento da colônia em meio de cultura comum, presença ou ausência de clamidósporos, entre outros caracteres (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Para *Fusarium* spp., a identificação em nível de espécie utilizando caracteres morfológicos é muitas vezes difícil, devido à alta variabilidade entre os isolados da mesma espécie e entre as diferentes espécies, além de, muitas vezes, serem afetados por qualquer alteração do ambiente (O'DONNELL et al., 2013). Com isso, muitas espécies de *Fusarium* sofreram com os vários sistemas taxonômicos aplicados no passado, a exemplo de *F. oxysporum*, que exibe uma subestrutura filogenética complicada e possui múltiplas espécies crípticas, ou seja, houve muito erro com a identificação baseadas somente em caracteres morfológicos (LOMBARD et al., 2019).

A identificação baseada no conceito biológico pode ser limitada, pois algumas espécies só possuem reprodução assexuada, existência de espécies que não são cultiváveis ou simplesmente a falta de condições ambientais para a reprodução sexuada, por apresentarem homotalismo e pela dificuldade de reprodução *in vitro* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Dentre as espécies com dificuldades na identificação, com base no conceito biológico, podemos citar *F. oxysporum*, pois o mesmo é definido pelo fenótipo assexuado, não possuindo forma sexual conhecida, embora estudos indiquem a possível presença de um ciclo sexual críptico (AOKI et al., 2014). Essa espécie utiliza mecanismos parassexuais entre os isolados heterocarióticos para ocorrer variabilidade genética (LESLIE, 1993).

O gênero *Fusarium* possui uma alta diversidade, tendo várias morfoespécies, representadas através de complexos de espécies (O'DONNELL et al., 2013). Além disso, observa-se um grande número de *formae speciales* existentes (O'DONNELL, 2000). Para as espécies inseridas no complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC), conhecido anteriormente como complexo *Gibberella fujikuroi* (FFSC), a utilização dos conceitos de espécie morfológica, biológica e filogenética tem contribuído significativamente para a taxonomia, permitindo a descrição mais robusta e confiável das espécies (LESLIE; SUMMERELL, 2006; KVAS et al., 2009).

O complexo *F. fujikuroi* (FFSC) é formado por 17 espécies biológicas e 65 espécies filogenéticas. As espécies desse complexo formam um grupo monofilético que possuem características morfológicas semelhantes, o que dificulta a sua diferenciação. Além disso, as espécies biológicas correspondem às espécies filogenéticas (O'DONNELL et al., 1998; KVAS et al., 2009).

A identificação de determinadas espécies de *Fusarium* spp. utilizando os conceitos morfológicos e biológicos eram aceitas como válidas e confiáveis anteriormente. Poletto et al. (2006) identificaram espécies de *Fusarium* spp., em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) utilizando caracteres morfológicos. Rocha et al. (2016) identificaram a espécie *Fusarium solani* f. sp. *piperis* em pimenta utilizando teste de compatibilidade sexual.

Muitos questionamentos foram resolvidos com a utilização de técnicas moleculares, sendo esta uma ferramenta para identificação de espécies de forma mais precisa, utilizada para complementar os testes de patogenicidade e caracterização morfológica para identificação de *Fusarium* spp. (KOYYAPPURATH et al. 2016).

Estudos biológicos e morfológicos, aliados as análises moleculares, tem sido de fundamental importância na reclassificação de espécies e grupos e identificação de novas espécies de forma mais confiável e precisa. Essas análises são feitas através de amplificação e análise de sequências de DNA de genes selecionados, fornecendo informações sobre a variabilidade e relações evolutivas dos mesmos (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

Uma das técnicas moleculares amplamente utilizadas para a identificação de fungos é a da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), que permite a amplificação de fragmentos específicos de DNA de células fúngicas. A identificação de espécies de *Fusarium* pode ser através de alinhamento de sequências das regiões gênicas calmodulina (CmdA), da primeira e segunda maior subunidade do RNA-polimerase (Rpb1 e Rpb2), fator de alongação 1- α (tef1) e β -tubulina (tub2) (LOMBARD et al., 2019), sendo esses marcadores filogenéticos poderosos dentro do gênero *Fusarium*.

A maioria das sequências do gene TEF1 estão disponíveis em bancos de dados, como *Fusarium-ID* (<http://isolate.fusariumdb.org/guide.php>) e *Fusarium* MLST (<http://www.cbs.knaw.nl/fusarium>) (KARLSSON et al., 2016), sendo esses considerado um dos principais bancos de dados das sequências gênicas de *Fusarium* spp.. O gene β -tubulina foi o primeiro codificador de proteína usado em *Fusarium* (O'DONNELL et al. 1998). No entanto, observou-se a presença de parálogos divergentes nos complexos de

espécies *F. solani*, *F. incarnatum-equiseti* e *F. chlamydosporum*, tornando a sua utilidade limitada (O'DONNELL et al., 2015).

No Brasil, não existem estudos relevantes sobre a diversidade genética de *Fusarium* spp. em girassol. Assim, é de grande importância avaliar marcadores morfológicos e estudar sua filogenia, gerando informações que possibilitem o entendimento da estrutura populacional, da patogenicidade e posteriormente o desenvolvimento de tratamentos eficientes.

3.5. Controle biológico de *Fusarium* spp. associado à sementes

Levando em consideração que doenças em plantas são originadas pelo inóculo primário, estando estes frequentemente associados às sementes, as medidas de controle visando os princípios de prevenção e exclusão têm sido as mais recomendadas. Nesse sentido, é importante fazer o uso de sementes isentas de patógeno, evitando assim a introdução do mesmo em áreas não infestadas (JIMÉNEZ-DÍAZ et al., 2015).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido, de forma geral, como a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (COOK; BAKER, 1983), ou seja, de forma geral, é a utilização de um microrganismo para controlar outro microrganismo. Os agentes com potencial para interferir nos processos vitais dos patógenos são chamados de antagonistas. Esses organismos devem estar adaptados ao mesmo nicho ecológico que os patógenos, podendo esse método ser integrado facilmente com métodos culturais e genéticos (MORANDI et al., 2009).

Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos no controle biológico são a antibiose (MARTINI et al., 2014; FARIAS et al., 2020), parasitismo, hiperparasitismo e micoparasitismo (SANTOS et al., 2012); competição (BENÍTEZ et al., 2004) e indução de resistência (ABDELRAHMAN et al., 2016).

As barreiras científicas e tecnológicas são desafios para o desenvolvimento e comercialização de produtos biológicos eficazes, como estabelecimento de métodos de triagem relevantes, desenvolvimento de formulações e aplicações adequadas, bem como monitoramento do antagonista que foi introduzido no agroecossistema (LEGRAND et al., 2017).

As principais espécies que estão em produtos comercializados pertencem ao gênero *Trichoderma* spp.. Pode-se destacar as espécies *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. stromaticum* e *T. viride*, estando disponíveis nas seguintes formulações: pós-molháveis, grânulos

dispersíveis, suspensões concentradas, óleos emulsionáveis, grãos colonizados e esporos secos, sendo indicados para o controle de *Fusarium* spp., *Pythium* spp., *Rhizoctonia* sp., *Macrophomina* sp., *Sclerotinia* spp., *Sclerotium* spp., *Botrytis* spp. e *Crinipellis* sp., sendo recomendados para inúmeras culturas, podendo ser utilizados através do tratamento de sementes ou incorporação ao solo (MORANDI et al., 2009).

O gênero *Trichoderma* spp. consiste em fungos de vida livre, que se reproduzem assexuadamente, presentes frequentemente em solos de regiões de clima temperado e tropical (MACHADO et al., 2012), sendo na maioria das vezes isolados a partir de solos florestais ou agrícolas e podendo ser cultivados *in vitro* (BROTMAN et al., 2010). Espécies de *Trichoderma* prevalecem especialmente em ambientes úmidos e podem ser isoladas de todas as zonas climáticas, incluindo solos de desertos (ABDELRAHMAN et al., 2016), tendo seu desenvolvimento favorecido por temperaturas acima de 25 °C (PAULA JÚNIOR et al., 2007). Esses antagonistas podem ser utilizados isoladamente ou misturados com outros produtos ou agentes (MORANDI et al., 2009).

Segundo Carvalho et al. (2015) os solos brasileiros são ricos em uma grande diversidade de espécies de *Trichoderma* spp.. E esses são alvo de inúmeras pesquisas, sendo fundamental para descoberta de isolados eficientes para uso no controle biológico de fitopatógenos em diversos agroecossistemas (MARCUIZZO; CARVALHO, 2018; REDDA et al., 2018). Esse antagonista é considerado o mais importante microrganismo utilizado no controle biológico, por ser eficaz contra uma ampla gama de fungos fitopatogênicos (SAITO et al., 2010). Com isso, a utilização de *Trichoderma* spp. como biofungicidas vem crescendo atualmente na agricultura (BETTIOL et al., 2009; ZEILINGER et al., 2016).

O gênero *Trichoderma* também é considerado um dos mais importantes microrganismos utilizados no tratamento de sementes. Este antagonista destaca-se devido à sua alta adaptabilidade ecológica, por interagir de forma benéfica com plantas, podendo suprimir doenças através de seus efeitos diretos sobre o patógeno com uma combinação de vários mecanismos, incluindo competição por nutrientes e/ou espaço, antibiose e micoparasitismo (DINESH et al., 2018) ou indiretamente, com a capacidade de induzir a defesa das plantas contra os patógenos (ZEILINGER et al., 2016).

Além de proteger a rizosfera das plantas contra patógenos, possui a capacidade de melhorar a taxa de germinação e o vigor das sementes, auxiliando também na absorção e concentração de nutrientes através do aumento do sistema radicular, promovendo o crescimento vegetal pela produção de hormônios e consequentemente o aumento do rendimento das plantas (CARVALHO et al., 2011).

Segundo Babu et al. (2015) *Trichoderma* spp. é considerado alternativa natural e ambientalmente aceitável às práticas agrícolas tradicionais, tanto para manejo da doença como para promoção do crescimento de várias culturas agrícolas. Diversas pesquisas têm mostrado a eficiência de *Trichoderma* spp. no controle de inúmeras espécies de *Fusarium* spp. associados à sementes.

Cheng et al. (2011) relataram que a proteína extracelular L-aminoácido oxidase secretado por *T. harzianum* ETS 323 está envolvida no antagonismo direto contra *Botrytis cinerea*, com hifas do patógeno mostrando uma resposta a apoptose-like, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), fragmentação de DNA e despolarização da membrana mitocondrial. Zeilinger et al., 2016, verificaram a ocorrência de mais de 22 metabólitos secundários responsáveis pelo controle de *F. oxysporum* f. sp. *cepa* agente causal da podridão basal na cebola (*Allium cepa* L.). Carvalho et al. (2011) verificaram o efeito antagônico de seis isolados de *T. harzianum* no controle de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) a utilização de isolados de *T. harzianum* mostrou-se eficiente tanto no controle *in vitro* como *in vivo* da murcha-de-fusário, causado por *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SALAZAR et al., 2011).

Milanesi et al. (2013) testaram a eficiência de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Fusarium* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja (*Glycine max* L.) e constataram que diferentes isolados foram eficientes no controle de *Fusarium* spp. tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e além disso, atuaram como promotores de crescimento de plântulas de soja nas condições testadas. Silva et al. (2019) observaram a atividade antagônica *in vitro* de *Trichoderma* sp. contra *F. subglutinans* e o efeito no tratamento de sementes de *Pinus* (*Pinus* spp.) com *Trichoderma* sp. sobre a podridão radícula, Oe concluíram que o antagonista possibilitou a redução da incidência da podridão com aumento da emergência e crescimento inicial das mudas.

Farias et al. (2019) observaram uma redução significativa da incidência e severidade da murcha de fusário no em plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) tratadas com produtos biológicos aplicados em sementes. Ferrigo et al. (2020) também constataram a capacidade de *T. harzianum* em antagonizar *F. verticillioides* e *F. graminearum* através do tratamento de sementes de milho infectadas naturalmente com esses patógenos, reduzindo significativamente a incidência e severidade da doença em plantas através da indução de resposta de resistência sistêmica na cultura. Com objetivo de identificar cepas de *Trichoderma* spp. com potencial de biocontrole contra *F. avenaceum* ou *F. culmorum* e testá-las no

revestimento de sementes de milho em condições de campo, Coninck et al. (2020) observaram que a cepa com potencial de biocontrole foi identificada como um *T. atroviride* e que o tratamentos das sementes aumentou significativamente a taxa de emergência de plântulas infectadas em comparação com sementes não tratadas.

O biocontrole de patógenos vegetais transmitidos por sementes, principalmente com o uso de *Trichoderma* spp., está se tornando uma estratégia importante para apoiar a agricultura sustentável. Vale ressaltar que os efeitos benéficos de *Trichoderma* spp. diferem em relação ao genótipo da planta, isolado fúngico e concentrações aplicadas (ISLAM et al., 2014), com isso, são necessárias pesquisas que ampliem o banco de dados de plantas hospedeiras a esse antagonista, bem como isolados eficientes aplicados no controle de patógenos agressivos para que se possa entender os mecanismos envolvidos no controle da doença.

Ao realizar seleção de cepas de microrganismos antagonísticos, espera-se que os mesmos sejam totalmente adaptados às condições edafoclimáticas locais, para se desenvolverem e controlarem os patógenos e que ao mesmo tempo produzam uma alta taxa de inóculo ao longo do período de sobrevivência e uma atividade de biocontrole suficiente para o uso em larga escala (CONINCK et al., 2020).

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, M.; ABDEL-MOTAAL, F.; EL-SAYED, M.; JOGAIAH, S.; SHIGYO, M.; ITO, S. I.; TRAN, L. S. P. Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepa* by target metabolite profiling. **Plant Science**, 246, 128-138, 2016.
- ADDRAH, M. E.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; LIU, L.; ZHOU, H.; CHEN, W.; ZHAO, J. Fungicide treatments to control seed-borne fungi of sunflower seeds. **Pathogens**, v. 9, n. 29, p. 1-17, 2020.
- AKLADIOUS, A. S.; ABBAS, S. M. Application of *Trichoderma harziunum* T22 as a biofertilizer supporting maize growth. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, p. 8672-8683, 2012.
- ALABOUVETTE, C.; OLIVAIN, C.; MIGHELI, Q.; STEINBERG, C. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, v. 184, p. 529-544, 2009.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; GEISER, D. M. Systematics of key phytopathogenic *Fusarium* species: current status and future challenges. **Journal of General Plant Pathology**, 80, 189 – 201, 2014.
- AOKI, T.; O'DONNELL, K.; SCANDIANI, M. M. Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. nov., *F. cuneirostrum* sp. nov., *F. tucumaniae* and *F. virguliforme*. **Mycoscience**, v. 46, n. 3, p. 162-183, 2005.
- AZEVEDO, L. A. **Fungicidas sistêmicos: teoria e prática**. 1. ed. Campinas: EMOPI, 2007.
- BABU, A. N.; JOGAIAH, S.; ITO, S. I.; NAGARAJ, A. K.; TRAN, L. S. P. Improvement of growth, fruit weight and early blight disease protection of tomato plants by rhizosphere bacteria is correlated with their beneficial traits and induced biosynthesis of antioxidant peroxidase and polyphenol oxidase. **Plant Science**, v. 231, p. 62-73, 2015.
- BECKMAN, C. H. **The nature of wilt disease of plants**. American Phytopathological Society: St Paul., MN, USA. 1987. 175 p.
- BENITEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Eds) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009.
- BORDAT, A.; MARCHAND, G.; LANGLADE, N. B.; POUILLY, N.; MUÑOS, S.; DECHAMP-GUILLAUME, G.; VINCOURT, P.; BRET-MESTRIES, E. Different geneticar

chit ectures underlie crop responses to the same pathogen: the (*Helianthus annuus*) interaction case for black stem disease and premature ripening. **BMC Plant Biology**, v. 17, p. 167, 2017.

BROTMAN, Y.; GUPTA, K. J.; VITERBO, A. *Trichoderma*. **Current Biology**, v. 20, p. 390-391, 2010.

BURGESS, L. W. General ecology of the Fusaria. In: ***Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy**. NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; COOK, R. J.(eds.). University Park, The Pennsylvania State University Press, PA, USA. p. 225-235, 1981.

CADORE, L. S.; VEY, R. T.; FRESINGHELLI, J. C. F.; DOTTO, L.; ETHUR, L. Z. Avaliação do crescimento inicial da soja utilizando formulações de *Trichoderma*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 15, n. 27, p. 170-179, 2018.

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

CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* in vitro e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 028-034, 2011.

CATÃO, H. C. R. M.; AQUINO, C. F.; SALES, N. L. P.; SOARES, E. P. S.; CAIXETA, F.; MARTINEZ, R. A. S. Sunflower seeds quality stored in uncontrolled conditions, treated with hydrolats and vegetable extracts. **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 9, p. 39295-39300, 2016.

CHAGAS, L. F. B.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; SOARES, L. P.; FIDELIS, R. R. *Trichoderma* na promoção do crescimento vegetal. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 4, n. 3, p. 97-102, 2017.

CHALAM, V. C.; DEEPIKA, D. D.; ABHISHEK, G. J.; MAURYA, A. K. Major Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: International Trade of Agricultural Products and Role of Quarantine. In **Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management**, Springer, Singapore. p. 25-61, 2020.

CHAND, H.; KHIRBAT, S. K. Chickpea wilt and its management - A Review. **Agricultural Reviews**, v. 30, p. 1-12, 2009.

CHENG, C. H.; YANG, C. A.; LIU, S. Y.; LO, C. T.; HUANG, H. C.; LIAO, F. C.; PENG, K. C. Cloning of a novel l-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 and bioactivity analysis of overexpressed l-amino acid oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 9142-9149, 2011.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos - décimo segundo levantamento, v.7, n.12 - Safra 2019/20 - Brasília, setembro de 2020. Publicado online em www.conab.gov.br. Disponível em: '<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>' [Recurso on-line]

CONINCK, E.; SCAUFLAIRE, J.; GOLLIER, M.; LIÉNARD, C.; FOUCART, G.; MANSSENS, G.; MUNAUT, F.; LEGRÈVE, A. *Trichoderma atroviride* como um promissor agente de biocontrole em recobrimento de sementes para redução do amortecimento de Fusarium em milho. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-15, 2020.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. Saint Paul: APS Press. 1983. 593p.

DANTAS, M. S.; ROLIM, M. M.; DUARTE, A. D. S.; PEDROSA, E. M.; TABOSA, J. N.; DANTAS, D. D. C. Crescimento do girassol adubado com resíduo líquido do processamento de mandioca. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 4, p. 350-357, 2015.

DIAMOND, J. M. **Guns, germs and steel: The fates of human societies**. Norton, W.W. and Company, Inc., 500 fifth Ave. New York, NY, 10110, 1999.

DINESH, K.; SINH, B.; BAI, A.T. In vitro studies on efficacy of various *Trichoderma* spp. Against collar rot of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. in Manipur. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 6, p. 1654-1656, 2018.

FARIAS, O. R.; LIMA CRUZ, J. M. F.; DUARTE, I. G. Controle *in vitro* de *Colletotrichum truncatum* do feijão fava (*Phaseolus lunatus*) por *Trichoderma* spp. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 12, p. 1-6, 2020.

FARIAS, O. R.; NASCIMENTO, L. C.; CRUZ, J. M. L.; SILVA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. D. M.; BRUNO, R. L. A.; ARRIEL, N. H. C. Biocontrol Potential of *Trichoderma* and *Bacillus* Species on *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 34, n. 2, p. 1-11, 2019.

FERRIGO, D.; MONDIN, M.; EDITH, L.; FABIO, F.; CAUSIN, R.; RAIOLA, A. Effect of seed biopriming with *Trichoderma harzianum* strain INAT11 on *Fusarium* ear rot and Gibberella ear rot diseases. **Biological Control**, v. 147, p. 104286, 2020.

GAUR, A.; KUMAR, A.; KIRAN, R.; KUMARI, P. Importance of Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Economic Losses and Impact on Society. In **Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management**, Springer, Singapore. p. 2-23, 2020.

GOMES, D. P.; BRINGEL, J. M. M.; MORAES, M. F. H.; GOMES, J. J. A.; LEITE, R. M. V. B. D. C. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de girassol produzidas na região de Timon, Maranhão. **Summa phytopathologica**, v. 32, n. 3, p. 291-292, 2006.

GOMES, D. P.; CAMPOS, R. M. V. B.; MORAES, M. F. H.; KRONKA, A. Z.; TORRES, S. B. Sanidade de sementes de girassol provenientes de três municípios do Estado do Maranhão. **Revista Caatinga**, v.21, n.1, p.55-63, 2008.

GONTCHAROV, S. V.; ANTONOVA, T. S.; SAUKOVA, S. L. Sunflower breeding for resistance to *Fusarium*. **Helia**, v. 29, n. 45, p. 49-54, 2006.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes**: noções gerais. 2. ed. Londrina: Embrapa Soja. 52p. Embrapa Soja. Documentos. 2005. 264p.

Index *Fungorum*. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/names/names.asp>>. Acesso em: 10 de outubro de 2020. [Recurso on-line]

IRSHAD, G.; GAZAL, H.; NAZ, F.; HASSAN, I.; BASHIR, A.; GHUFFAR, S. Detection and in-vitro management of seed borne mycoflora associated with sunflower and zinnia. **Pakistan Journal of Phytopathology**, v. 29, n. 1, p. 07-16, 2017.

JENDOUBI, W.; BOUHADIDA, M.; BOUKTEB, A.; BÉJI, M.; KHARRAT, M. *Fusarium* wilt affecting chickpea crop. **Agriculture**, v. 7, n. 3, p. 23, 2017.

JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M., CASTILLO, P., JIMÉNEZ-GASCO, M. D. M., LANDA, B. B., NAVAS-CORTÉS, J. A. *Fusarium* wilt of chickpeas: Biology, ecology and management. **Crop Protection**, v. 73, p. 16-27, 2015.

KARLSSON, I.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; DURLING, M. B.; KOLSETH, A. K.; STEINBERG, C.; PERSSON, P.; FRIEBERG, H. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 491-501, 2016.

KAWUBE, G.; KANOBE, C.; EDEMA, R.; TUSIIME, G.; MUDINGOTTO, P. J.; ADIPALA, E. Efficacy of manual seed sorting methods in reduction of transmission of rice and cowpea seed-borne diseases. **African Crop Science Conference Proceeding**, v. 7, p. 1363-1367, 2005.

KEERIO, A.; NIZAMANI, Z. A.; HUSSAIN, S.; RAFIQ, M.; IQBAL, S.; KEERIO, A. Efficacy of some chemical fungicides against fusarium wilt of sunflower *in-vitro* condition cause by *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Botany Studies**, v. 2, n. 5, p. 80-85, 2017.

KOYYAPPURATH, S.; ATUAHIVA, T.; LE GUEN, R.; BATINA, H.; LE SQUIN, S.; GAUTHERON, N.; HERMANN, V. E.; JAHIEL, M.; STEINBERG, C.; LIEW, E. C. Y.; ALABOUVETTE, C.; BESSE, P.; DRON, M.; SACHE, I.; LAVAL, V.; GRISONI, M. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. **Plant Pathology**, v. 65, p. 612-625, 2016.

KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 1-21, 2009.

LASCA, D. H. C. Produção de girassol em São Paulo. **Reunião Nacional de Pesquisa de Girassol. Goiânia (Brazil)**, p. 9-11, 1993.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F.; JUCÉLI MÜLLER, J.; ARAÚJO, M. M. Tratamento biológico e químico em sementes de *Cedrela fissilis* para controle de *Rhizoctonia* sp. **Cerne**, v. 19, n.1, p. 169-175, 2013.

LEGRAND, F.; PICOT, A.; COBO-DÍAZ, J. F.; CHEN, W.; LE FLOCH, G. Desafios das estratégias de controle biológico para o manejo da giberela de cereais causada por *F. graminearum*. **Biological Control**, v. 113, p. 26-38, 2017.

LESLIE, J. F. Fungal vegetative compatibility. **Annual Review of Phytopathology**, v. 31, p. 127-150, 1993.

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

LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS, P. W. Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, v. 43, p. 1-47, 2019.

LUSTRI, E. A.; SILVA, B. T.; PERUCHI, D. R. E.; MOURA, I. A.; FLUMINHAN, A. Avaliação do desempenho agrônômico de cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.) no cultivo em safrinha na região Oeste Paulista. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 13, n. 1, p. 37-51, 2017.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MACHADO, J. C. Patologia de Sementes: Significado e Atribuições. In: CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. S.: **Sementes: Ciências, Tecnologia e Produção**. Jaboticabal: Funep. p. 524-582, 2012.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas**. Piracicaba: Fealq. 2005. 495p.

MARCUZZO, L. L.; CARVALHO, J. Avaliação de formulados biológicos no crescimento e manejo da raiz rosada em cebolinha-verde. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 88-89, 2018.

MARTINI, L. B.; ETHUR, L. Z.; DORNELES, K. R. Influência de metabólitos decendários de *Trichoderma* spp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de arroz. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 86-91, 2014.

MENDGEN, K., HAHN, M., DEISING, H. Morphogenesis and engines of penetration by fit pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, p. 367-386, 1996.

MILANESI, P. M.; BLUME, E.; ANTONIOLI, Z. I.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F.; FINGER, G.; DURIGON, M. R. Biocontrole de *Fusarium* spp. com *Trichoderma* spp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 347-356, 2013.

MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BETTIOL, W.; TEIXEIRA, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe Agropecuário**, v. 30, p. 73-82, 2009.

MUKHTAR, I. Sunflower disease and insect pests in Pakistan: A review. **African crop science journal**, v. 17, n. 2, p. 109-118, 2009.

NELSON, P. E. History of *Fusarium* systematics. **Phytopathology**, v. 81, n. 9, p. 1045-1048, 1991.

NUNES, B. T.; PILON, A.; FLUMINHAN, A. Avaliação do desempenho agrônômico de genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) cultivada dos na Região Oeste paulista e análise do rendimento de óleo, matéria seca e proteína bruta. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 1, p. 150-165, 2013.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, p. 465-493, 1998.

O'DONNELL, K.; ROONEY, A. P.; PROCTOR, R. H.; BROWN, D. W.; MCCORMICK, S. P.; WARD, T. J.; FRANDSEN, R. J. N.; LYSOE, E.; REHNER, S. A.; AOKI, T.; ROBERT, V. A. R. G.; CROUS, P. W.; GROENEWALD, J. Z.; KANG, S.; GEISER, D. M. Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. **Fungal Genetics and Biology**, v. 52, p. 20-31, 2013.

O'DONNELL, K. Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. **Mycologia**, v. 92, n. 5, p. 919-938, 2000.

O'DONNELL, K.; SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A.; MCCARTHY, D.; RINALDI, M. G.; BRANDT, M. E.; ZHANG, N.; GEISER, D. M. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2477-2490, 2007.

O'DONNELL, K.; WARD, T. J.; ROBERT, V. A.; CROUS, P. W.; GEISER, D. M.; KANG, S. DNA sequence-based identification of *Fusarium*: Current status and future directions. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 5, p. 583-595, 2015.

PATEL, R. M.; JASRAI, Y. T. Antifungal potency of *Eucalyptus globuleslabill* essential oil against important plant pathogenic fungi. **CIBTech Journal of Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 42-52, 2015.

PAULA JÚNIOR, T. J.; TEIXELRA, H.; FADI, N. M. A. M.; VENZON, M.; JESUS JÚNIOR, W. C.; MORANDI, M. A. B.; PALLINI, A. Interações entre fitófagos e patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 15, p. 353-402, 2007.

PELEGRINI, B. **Girassol**: uma planta solar que das américas conquistou o Mundo. São Paulo: Ícone. 1985. 117p.

PESKE, S. T.; ROSENTHAL, M. D.; ROTA, G. R. M. **Sementes**: fundamentos científicos e tecnológicos. 3.a ed. Pelotas: Editora Rua Pelotas. 2012. 573 p.

POLETO, I.; MUNIZ, M. F. B.; CECONI, D. E.; SANTIN, D.; WEBER, M. N. D.; BLUME, E. Zoneamento e identificação de *Fusarium* spp. causadores de podridão de raízes

em plantios de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) na região do Vale do Taquari, RS. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2006.

RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R. D. C.; VIEIRA, R. D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 24-31, 2014.

RAUF, S.; JAMIL, N.; TARIQ, S. A.; KHAN, M.; KAUSAR, M.; KAYA, Y. Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 7, p. 1997-2006, 2017.

REDDA, E.T.; MA, J.; MEI, J.; LI, M.; WU, B.; JIANG, X. Biological Control of Soilborne Pathogens (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumeris*) of Cucumber (*Cucumis sativus*) by *Trichoderma* sp. **Journal of Life Sciences**, v. 12, p. 1-12, 2018.

ROCHA, F. D. S.; FERREIRA, G. H. S.; SILVA, T. C. S. R.; AMARAL, F. L.; MUNIZ, M. D. F. S.; PEREIRA, E. A. Caracterização de *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, produção de fitotoxina e incidência da fusariose no norte de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 67-72, 2016.

SAITO, L. R.; SALES, L. L. S. R.; MARTINCKOSKI, L.; ROYER, R.; RAMOS, M. S.; REFFATTI, T. Aspects of the effects of the fungus *Trichoderma* spp. in biocontrol of pathogens of agricultural crops. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 203-216, 2010.

SALAZAR, L.; SANABRIA, N.; APONTE, G.; ALCANO, M.; HERRERA, R.; COLMENARES, D.; ESPINOZA, M.; ALEMÁN, L.; MAGAÑA, S. Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp., en el control de la fusariosis del tomate en condiciones *in vitro* e *in vivo*. **Bioagro**, v. 23, n. 3, p. 185-190, 2011.

SANTOS, C. C.; OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, M. S.; TALAMINI, V.; FERREIRA, J. M. S.; SANTOS, F. J. Influência de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento micelial de *Thielaviopsis paradoxa*. **Scientia Plena**, v. 8, n. 4, p. 1-5, 2012.

SHARFUN-NAHAR.; MUHAMMAD, M. Pathogenecity and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species (sec. *Liseola* and *Sporotrichiella*) in sunflower. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 487-492, 2006.

SHARFUN-NAHAR.; MUHAMMAD, M. Pathogenic effects and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species in sunflower. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 645-649, 2007.

SHARMA, M.; SENGUPTA, A.; GHOSH, R.; AGARWAL, G.; TARAFDAR, A.; NAGAVARDHINI, A.; PANDE, S.; VARSHNEY, R. K. G. Genome wide transcriptome profiling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* conidial germination reveals new insights into infection-related genes. **Scientific reports**, v. 6, n. 3, 37353, 2016.

SILVA FLÁVIO, N. S. D.; SALES, N. D. L. P.; AQUINO, C. F.; SOARES, E. P. S.; AQUINO, L. F. S.; CATÃO, H. C. R. M. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de

sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 7-20, 2014.

SILVA, T. W. R.; SANTOS, A. F. D.; AUER, C. G.; TESSMANN, D. J. Pine Seeds Treatment with *Trichoderma* for *Fusarium* Control. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, e20170875, 2019.

SINGH, G.; CHEN, W.; RUBIALES, D.; MOORE, K.; SHARMA, Y. R.; GAN, Y. Chickpea Breeding and Management. In: Kantar, F. (Ed.). **Chickpea Breeding and Management**. p. 179-192, 2007.

ŠIŠIĆ, A.; BAĆANOVIĆ-ŠIŠIĆ, J.; AL-HATMI, A. M.; KARLOVSKY, P.; AHMED, S. A.; MAIER, W.; FINCKH, M. R. The 'forma specialis' issue in *Fusarium*: a case study in *Fusarium solani* f. sp. pisi. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-17, 2018.

STATISTA. (2020). Production volume of sunflower seed in major producer countries in 2019/2020. Publicado online em www.statista.com. Disponível em: '<https://www.statista.com/statistics/263928/production-of-sunflower-seed-since-2000-by-major-countries/>' [Recurso on-line]

SUMMERELL, B. A.; LAURENCE, M. H.; LIEW, E. C. Y.; LESLIE, J. F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. **Fungal Divers**, 44, 3-13, 2010.

TALAMINI, V.; ALMEIDA, N.; LIMA, N.; AMF, S.; CARVALHO, H. W. L.; SOUSA, R. C. (2011). Avaliação da qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de girassol introduzidas para cultivo em Sergipe. **Embrapa Tabuleiros Costeiros-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**.

UNGARO, M. R. G. O girassol no Brasil. **O Agrônomo**, 34, p.43-62, 1982.

WINGFIELD, M. J.; DE BEER, Z. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, B. D.; GROENEWALD, J. Z.; LOMBARD, L.; CROUS, P. W. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. **Molecular Plant Pathology**, v. 13, p. 604-613, 2012.

XU, X.; NICHOLSON, P. Community ecology of fungal pathogens causing wheat head blight. **Annual Review of Phytopathology**, v. 47, p. 83-103, 2009.

YAMGAR, S. V.; DHONE, P. U.; PATHARE, S. M.; KARANDE, G. R. Cytoplasmic Diversity Studies in Sunflower (*Helianthus annuus* L.): A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n. 2, p. 36-41, 2018.

ZEILINGER, S.; GRUBER, S.; BANSAL, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* e chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; GAO, J.; ZHANG, G.; YU, Y.; ZHOU, W.; CHEN, W.; ZHAO, J. The Colonization Process of Sunflower by a Green Fluorescent Protein-Tagged Isolate of *Verticillium dahliae* and its Seed Transmission. **Plant Disease**, v. 102, p. 1772–1778, 2018.

CAPÍTULO II

ESPÉCIES DE *Fusarium* ASSOCIADAS A SEMENTES DE GIRASSOL: CARACTERIZAÇÃO POLIFÁSICA E TRANSMISSÃO

FARIAS, O. R. **Espécies de *Fusarium* associadas a sementes de girassol: caracterização polifásica e transmissão** (Doutorado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB. 2020.

RESUMO

Espécies de *Fusarium* são responsáveis por causar deterioração de sementes, podridão radicular e murcha em girassol. Esse patógeno é disseminado e transmitido através de sementes. A identificação desse patógeno a nível de espécie é de fundamental importância no conhecimento evolutivo e epidemiológico, implicando diretamente no manejo da doença. O objetivo desse trabalho foi identificar as espécies de *Fusarium* associado a sementes de girassol no Brasil, bem como determinar a prevalência e a transmissão semente-plântula dessas espécies. Amostras de sementes de oito cultivares de girassol foram utilizadas, das quais se obteve um total de 50 isolados de *Fusarium* spp.. A caracterização molecular dos isolados foi realizada utilizando sequências do gene fator de alongamento (EF1) e o gene β -tubulina 2 (tub2). Para caracterização morfológica foram realizadas avaliações após cultivo do fungo *in vitro* e observações em microscopia: pigmentação da colônia; presença ou ausência de esporodóquios; tamanho (comprimento e largura), formato e septação de microconídios e macroconídios; tipos de fiálides (monofiálide e/ou polifiálide); presença ou ausência de clamidósporos; microconídios em falsas cabeças e/ou cadeia; crescimento micelial; índice de velocidade de crescimento micelial e produção de conídios. A prevalência foi calculada pelo número total de determinada espécie oriunda na cultivar em relação ao número total de espécies. Para avaliação da transmissão, realizou-se a inoculação através do contato direto entre as sementes da cv. BRS 324 e a colônias do patógeno em meio BDA contendo manitol. Foram avaliadas a porcentagem de emergência, sementes não germinadas com e sem *Fusarium* spp., plântulas sintomáticas e assintomáticas e taxa de transmissão. *F. fabacearum*, *F. pseudocircinatum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram identificados nas sementes de girassol avaliadas. Observou-se uma ampla variabilidade morfológica entre os isolados, principalmente com relação à pigmentação da colônia, crescimento micelial, índice de velocidade de crescimento micelial e produção de conídios. *F. proliferatum* foi a espécie mais prevalente nas diferentes cultivares. Além do apodrecimento das sementes, observaram-se sintomas de podridão do colo, tombamento, escurecimento vascular, subdesenvolvimento e podridão das folhas cotiledonares. Todos os isolados das quatro espécies avaliadas foram patogênicos e transmitidos via sementes. Esta pesquisa fornece informações importantes sobre *Fusarium* spp. associado a sementes de girassol no Brasil e confirma a importância dos estudos moleculares para a identificação das espécies e para a observação da diversidade genética, sendo esses conhecimentos fundamentais para estudos ecológicos desse patógeno.

PALAVRAS-CHAVE: *Helianthus annuus* L.. Patologia de sementes. Diversidade.

FARIAS, O. R.. *Fusarium* species associated with sunflower seeds: **Polyphasic characterization and transmission** (Doctorate in Agronomy). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB. 2020.

ABSTRACT

Fusarium species are responsible for causing seed deterioration, root rot and sunflower wilt. This pathogen is disseminated and transmitted through seeds. The identification of this pathogen at the species level is of fundamental importance in the evolutionary and epidemiological knowledge, directly implicating in the management of the disease. The objective of this work was to identify *Fusarium* species associated with sunflower seeds in Brazil, as well as to determine the prevalence and seed-seedling transmission of these species. Seed samples from eight sunflower cultivars were used, from which a total of 50 isolates of *Fusarium* spp were obtained. The molecular characterization of the isolates was performed using sequences of the elongation factor (EF1) gene and the β -tubulin 2 gene (tub2). For morphological characterization, evaluations were carried out after cultivation of the fungus in vitro and microscopic observations: colony pigmentation; presence or absence of sporodochia; size (length and width), shape and segregation of microconidia and macroconidia; types of phialides (single-phial and / or poly-phyllid); presence or absence of chlamydospores; microconidia in false heads and / or chain; mycelial growth; mycelial growth rate index and conidia production. The prevalence was calculated by the total number of a specific species from the cultivar in relation to the total number of species. In order to evaluate transmission, inoculation was carried out through direct contact between cv. BRS 324 and colonies of the pathogen in BDA medium containing mannitol. The percentage of emergence, seeds not germinated with and without *Fusarium* spp., Symptomatic and asymptomatic seedlings and transmission rate were evaluated. *F. fabacearum*, *F. pseudocircinatum*, *F. verticillioides* and *F. proliferatum* were identified in the evaluated sunflower seeds. There was a wide morphological variability among the isolates, mainly with respect to colony pigmentation, mycelial growth, mycelial growth rate index and conidia production. *F. proliferatum* was the most prevalent species in the different cultivars. In addition to the rotting of the seeds, symptoms of neck rot, tipping, vascular darkening, underdevelopment and rot of cotyledonous leaves were observed. All isolates of the four species evaluated were pathogenic and transmitted via seeds. This research provides important information about *Fusarium* spp. associated with sunflower seeds in Brazil and confirms the importance of molecular studies for the identification of species and for the observation of genetic diversity, which are fundamental knowledge for ecological studies of this pathogen.

KEYWORDS: *Helianthus annuus* L.. Seed pathology. Diversity.

1. INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma das principais culturas oleaginosas cultivadas mundialmente (ZHANG et al., 2018), em 2020 ocupou uma área plantada de 47,1 mil há, com produtividade de 1.599 kg/ha e produção de 74,9 mil toneladas (CONAB, 2020). As sementes dessa cultura possuem alto teor de óleo de alta qualidade, usado principalmente para consumo humano (ADDRAH et al., 2020). O óleo de girassol é o segundo óleo vegetal mais consumido no mundo, atrás apenas do óleo de soja (NUNES et al., 2013). Além do uso como óleo comestível, o girassol também pode ser utilizada como ornamental, alimento para pássaros e na produção de biodiesel, bem como na medicina popular para fins de tratamento inflamatórios, infecções e enfermidades crônicas (CATÃO et al., 2016; LUSTRI et al., 2017).

Apesar da adaptabilidade a diferentes condições edafoclimáticas o plantio de girassol é afetado por patógenos fúngicos transmitidos via sementes, sendo considerados uns dos principais entraves à sua produção (ADDRAH et al., 2020). Em virtude dos danos ocasionados pelos patógenos às sementes do girassol, principal produto de interesse econômico para produção de óleo, a sua qualidade sanitária tem despertado o interesse dos produtores. As sementes constituem um meio eficiente de sobrevivência e disseminação para a maioria dos fitopatógenos (CHALAM et al., 2020). Múltiplas espécies de *Fusarium* são encontradas associadas a sementes de milho, trigo, feijão, arroz e soja, dentre outras culturas (GUO et al., 2016; IGNJATOV et al., 2016; GAI et al., 2018; DEEPAK et al., 2019; SUSANI et al., 2020; CHANG et al., 2020).

O gênero *Fusarium* é um dos patógenos mais importantes na patologia vegetal, sendo responsável por causar podridão radicular e murcha em culturas de importância econômica. Várias espécies podem produzir micotoxinas, substância tóxica à humanos e animais (LESLIE; SUMMERELL, 2006). Atualmente, pelo menos treze espécies de *Fusarium* são relatadas associadas a sementes e causando danos expressivos em girassol, incluindo *F. anthophilum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. chlamydosporum*, *F. sporotrichioides* (SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2006), *F. equiseti*, *F. longipes*, *F. scirpi*, *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum* e *F. solani* (SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2007), *F. oxysporum* e *F. incarnatum* (ADDRAH et al., 2020).

Os sintomas típicos causados por *Fusarium* spp. em plantas de girassol incluem murcha, nanismo, clorose, necrose, queda de folhas jovens, amortecimento e escurecimento vascular (KEERIO et al., 2017). Também é responsável por ocasionar apodrecimento de sementes (SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2006). As sementes infectadas são afetadas

principalmente durante o estabelecimento inicial da cultura, resultando na redução significativa da emergência e crescimento de plântulas (SRINIVAS et al., 2017).

Fusarium é considerado como um dos gêneros fúngicos mais importantes economicamente no mundo, sendo encontrado associado a uma ampla gama de hospedeiros. Anteriormente, a identificação das espécies de *Fusarium* era realizada com base em características morfológicas e culturais (KOYYAPPURATH et al., 2016). No entanto, os caracteres morfológicos podem variar de acordo com fatores ambientais, como meio de cultura e temperatura. Atualmente, a identificação de espécies de *Fusarium* é realizada usando uma abordagem polifásica que combina características morfológicas e culturais com análise filogenética multilocus de sequências de DNA (KVAS et al., 2009).

Além da identificação, estudos da taxa de transmissão de *Fusarium* spp., via sementes, contribui para o estabelecimento de padrões de tolerância dentro do processo de certificação de sementes (KUMAR et al., 2020). Ainda existem dúvidas quanto a relação de *Fusarium* spp causando danos em sementes de girassol e não há relação da porcentagem de transmissão das diferentes espécies desse patógeno identificadas nas sementes de girassol, tampouco, uma relação da infecção fúngica com o vigor de sementes e desenvolvimento iniciais das plantas.

Embora existam vários relatos de espécies de *Fusarium* em associação com girassol, não há informações sobre a diversidade, prevalência e transmissão das espécies de *Fusarium* associado a semente de girassol no Brasil. Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar as espécies de *Fusarium* associado a sementes de girassol no Brasil, bem como determinar a prevalência e a transmissão semente-plântula dessas espécies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização experimental

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT) do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, localizado em Areia-PB, Brasil e no Laboratory of Plant Virology and Laboratory of Mycology, do Mediterranean Institute for Agriculture, Environment and Development, pertencente à Universidade de Évora, localizada em Évora, Portugal.

2.2. Obtenção e preservação dos isolados de *Fusarium*

Os isolados foram obtidos de sementes girassol das cultivares Aguará 04, Aguará 06, Olisun 3, Hélio 250, BRS 321, BRS 322, BRS G26, GF 101, safra 2017-2018, fornecidas pelas Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Algodão). As sementes mal formadas e danificadas por pragas (sementes parcial ou totalmente destruídas, com perfurações que atingiram o embrião) foram descartadas.

As sementes de girassol infectadas foram submetidas ao *blotter test* (BRASIL, 2009), utilizando 200 sementes (dez repetições de vinte sementes), previamente desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 3 minutos, para eliminação dos fungos aderidos externamente nas sementes. As sementes foram distribuídas individualmente em placas de Petri ($\varnothing$ 15 cm), contendo dupla camada papel filtro previamente esterilizados e umedecidos com 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) e mantidas por período de sete dias à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. As estruturas características de *Fusarium* que cresceram sobre as sementes foram transferidas, com o auxílio de agulha histológica, para placas de Petri, contendo meio de cultura batata-dextrose-água (BDA). As placas de Petri foram incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias. Culturas puras foram estabelecidas a partir de esporos únicos para aqueles isolados identificados como *Fusarium* com base em características morfológicas de acordo com (LESLIE; SUMMERELL, 2006) (Tabela 1). Os isolados foram preservados pelo método Castellani (CASTELLANI, 1939).

2.3. Análise filogenética

2.3.1. Extração de DNA, amplificação por PCR e sequenciamento de DNA.

Os isolados de *Fusarium* foram cultivados em BDA por 5-10 dias a $26 \pm 3^\circ\text{C}$. A extração foi realizada com kit de DNA (Invitrogen PureLink Genomic DNA Mini Kit) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração total do DNA extraído foi determinada usando espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

O gene do fator de alongamento (EF1) foi inicialmente amplificado usando Fa + 7 e Ra + 6 (KARLSSON et al., 2016) e sequenciado para todos os isolados de *Fusarium* para estimativa inicial da diversidade genética e seleção de isolados representativos para análises multilocus. Os diferentes haplótipos foram identificados usando DnaSP 4.0 (ROZAS et al., 2003). Os isolados representativos foram escolhidos de acordo com a cultivar de girassol. Região parcial do gene da β -tubulina 2 (tub2) foram amplificados usando T1 e T22 (O'DONNEL; CIZELNIK, 1997) e sequenciados para os isolados representativos.

Reações da PCR foi realizada em um volume final de 50 μL , contendo a mistura de 7-20 ng de DNA genômico, Tris-HCl 10 mM (pH 8,6), KCl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM (Fermentas), 0,2 μM de cada primer e 2,5 U de DreamTaq DNA polimerase (Fermentas). As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (BioRad), usando os seguintes ciclos: desnaturação inicial de 95°C por 2 min, seguidos de 40 ciclos: desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 67°C (EF) ou 58°C (tub2) por 50s, extensão a 72°C por 60s e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1,0X e fotografados sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados usando DNA Clean & Concentrator (Zymo Research) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento de DNA foi realizado pela Macrogen (Holanda).

2.3.2. Alinhamento de sequências e análises filogenéticas

Os consensos foram montados usando o Staden Package (STADEN et al., 1998). Todas as sequências consensos obtidas foram usadas como consultas no banco de dados *Fusarium*-ID (GEISER et al., 2004) e no banco de dados de nucleotídeos National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando o algoritmo de Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) (JOHNSON et al., 2008) para confirmar as atribuições taxonômicas dos

isolados. As sequências *ex-types* de *Fusarium* foram obtidas do GenBank, onde foram depositadas as sequências geradas neste estudo.

O alinhamento das múltiplas sequências de cada *locus* individual foi estimado *on-line* usando a estratégia G-INS-i na versão MAFFT 7 (KATOHI; STANDLEY, 2013; KATOHI et al., 2019), com parâmetros padrão para abertura e extensão de gap e 200PAM / $\kappa=2$ matriz de pontuação de nucleotídeos e ajustado manualmente, quando necessário, usando o MEGA6 (TAMURA et al., 2013).

As análises filogenéticas foram realizadas usando os métodos de Máxima Verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) para os gene individuais e concatenados. As análises de MV e IB foram executadas usando RAXML-HCP2 v.7.0.4 (STAMATAKIS, 2014) e MrBayes v 3.2.1 (RONQUIST et al., 2012), respectivamente, implementadas no Portal CIPRES Science Gateway (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>). As análises de MV foram conduzidas com 1000 bootstrap (-m GTRGAMMA -p 12345 -k -f a -N 1000 -x 12345) sob modelo GTRGAMMA.

Para BI, os modelos de substituição de nucleotídeos foram estimados no MrModeltest 2.3 (NYLANDER, 2004), usando o critério de informação de Akaike (AIC) para cada gene individualmente. A matriz concatenada foi particionada com cada gene com seu referente modelo de substituição de nucleotídeos. Quatro cadeias de Markov Monte Carlo 174 (MCMC) foram conduzidas por 5×10^7 gerações e as árvores foram amostradas a cada 1000 gerações. A convergência de todos os parâmetros foi verificada usando Tracer v 1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2010) e os primeiros 25% das gerações foram descartados como *burn-in*. A versão 1.4.3 do FigTree (RAMBAUT, 2012) foi usada para visualizar a árvore filogenética.

2.4. Análise morfológica dos isolados

Os isolados representativos serão caracterizados morfolologicamente utilizando os meios nutritivos Batata Dextrose Ágar (BDA) e Syntetic Nutrient-Poor Ágar (SNA) (NELSON, 1987). A caracterização morfológica será realizada quanto à taxa de crescimento, produção de conídios, pigmentação da colônia e micromorfologia, seguindo os protocolos de Leslie; Summerell (2006).

A pigmentação da colônia será observada em isolados crescidos em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, incubados a 25 ± 2 °C por um período de 10-14 dias. A coloração do verso e reverso das colônias, visualizada no fundo das placas.

As características micromorfológicas serão avaliadas nos isolados crescidos em SNA contendo folhas de cravo, incubados a 25 ± 2 °C por um período de 10-14 dias. As características morfológicas observadas serão à presença ou não de esporodóquios; tamanho (comprimento e a largura), formato e septação de microconídios e macroconídios (com base na medição de 15 estruturas); tipos de fiálides (monofiálide e/ou polifiálide); presença ou ausência de clamidósporos; microconídios em falsa cabeça e/ou cadeia.

As dimensões dos macros e microconídios serão obtidas por meio do programa Motic Images Plus 2.0, instalado em computador acoplado a um microscópio Olympus BX53, com fotografias registradas através da câmera Olympus DP73 com auxílio do programa CellSens Dimension em aumento de 20, 40 e 100x.

Para avaliação do crescimento micelial, um disco de 5mm de diâmetro será transferido da margem das colônias dos isolados de *Fusarium* spp. para placas de Petri, com tamanho de 9 cm de diâmetro, contendo meio de cultura BDA. As placas serão incubadas a 25 ± 2 °C no escuro. O diâmetro das colônias será mensurado com paquímetro digital, diariamente, até sete dias de incubação. Serão avaliadas, para cada isolado, quatro placas de Petri, com colônias do fungo em BDA (cada placa de Petri será considerada como repetição).

Os dados do crescimento das colônias também serão utilizados para estimar índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), através de fórmula proposta por Oliveira (1991): $IVCM = (D - D_a) / N$, sendo: IVCM=índice de velocidade de crescimento micelial; D=diâmetro médio atual da colônia; D_a =diâmetro médio da colônia do dia anterior; N=número de dias após a inoculação na placa de Petri.

A avaliação da produção de conídios pelos isolados de *Fusarium* spp. será realizada com o patógeno crescido em BDA, incubados a 25 ± 2 °C por período de 7 dias. A contagem de esporos será realizada em suspensão aquosa adicionada de Tween 20. Essa suspensão será obtida pela adição de 20 mL de ADE às placas de Petri contendo as colônias fúngicas e o auxílio de um pincel de cerdas macias para a liberação dos esporos. A suspensão de esporos será filtrada em dupla camada de gaze esterilizada e a contagem realizada em hemacitômetro (ALFENAS; MAFIA, 2016).

2.5. Prevalência de espécies de *Fusarium*

A prevalência de espécies de *Fusarium* spp. obtidas de sementes de diferentes cultivares de girassol foi determinada pelo cálculo da Taxa de Isolamento (IR), de acordo com fórmula proposta por Veloso et al. (2018), sendo da seguinte forma: $IR (\%) = (C_x / C_t) \times 100$,

onde: Cx é o número de isolados pertencentes a uma espécie e Ct é o número de isolados por cultivar.

2.6. Transmissão semente-plântula de *Fusarium* spp.

A inoculação dos isolados de *Fusarium* spp. foi realizada através da técnica de condicionamento fisiológico desenvolvida por Sousa et al. (2008), na qual os isolados fúngicos foram cultivados em meio BDA + manitol com potencial osmótico ajustado para $-1,0$ MPa. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas por 7 dias.

Após o crescimento micelial dos isolados alcançar toda superfície do substrato, as sementes desinfestadas foram distribuídas sobre as colônias fúngicas, permitindo que as mesmas entrassem em contato com a cultura do patógeno, onde permaneceram em incubação a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas por 48 horas. As sementes do tratamento controle foram adicionadas em substrato com o restritor hídrico, na ausência de *Fusarium* spp..

Transcorrido o período de incubação, as sementes foram distribuídas em vasos plásticos (10 L) a uma profundidade de 2 cm, contendo substrato comercial Brasplant® e vermiculita (2:1 v/v) esterilizados. Os vasos permaneceram em casa de vegetação durante 25 dias, com temperatura oscilando de 28 a 32 °C durante o dia e de 16 a 18 °C durante a noite. A irrigação foi realizada duas vezes ao dia, via rega manual.

No teste de transmissão, avaliou-se a porcentagem de plântulas emersas aos 14 dias após o semeio (BRASIL 2009). As sementes não germinadas foram retiradas, lavadas em hipoclorito de sódio a 1%, seguida de ADE e colocadas em câmara úmida, na qual permaneceram por sete dias, para identificação de sementes não germinadas com *Fusarium* spp (NCF) ou sem *Fusarium* spp. (NCF) associados.

Aos 25 dias calculou-se a porcentagem de plântulas sintomáticas e assintomáticas que foram coletadas, lavadas em água corrente, para retirada do excesso de solo aderido ao sistema radicular e levadas ao Laboratório de Fitopatologia. Em cada plântula foram retirados dois fragmentos do feixe vascular (seccionou a plântula e retirou os fragmentos em locais com lesões), e realizada a assepsia do material em álcool 70% por 30 segundos, seguido por hipoclorito de sódio 1% por 30 segundos, lavadas duas vezes ADE e colocados em placas de Petri com meio BDA. O material foi incubado em *Biological Oxygen Demand* (BOD) a 25 ± 2 °C por sete dias e fotoperíodo de 12 horas. Foi considerada infectada a plântula na qual foi possível identificar as estruturas do patógeno sob o material vegetal.

A taxa de transmissão foi determinada com base na taxa de plântulas sintomáticas e incidência de cada isolado de *Fusarium* spp. nas sementes inoculadas, por meio da fórmula proposta por Goulart (1996): Taxa de transmissão (%) = (Porcentagem de plântulas infectadas/Incidência do isolado nas sementes) x 100. Ao final, a incidência da doença foi calculada com base na seguinte fórmula: Incidência da doença (%) = $(n / N) \times 100$, onde, n = número de sementes não germinadas com *Fusarium* spp. (NCF) e plantas infectadas e N = número total de sementes e plantas examinadas.

A incidência de doença no girassol foi calculada pela soma da porcentagem de sementes não germinadas com *Fusarium* spp. (NCF) e porcentagem de plântulas sintomáticas. Os isolados também foram distribuídos em quatro grupos de virulência, segundo avaliação proposta por Bashyal et al. (2016): não virulento (incidência da doença de 0%), baixa virulência (incidência da doença de 2–25%); moderada virulência (incidência da doença de 26- 50%); e alta virulência (incidência da doença de 51-100%).

2.7. Delineamento e análise dos dados

O delineamento utilizado para todos os testes foi inteiramente casualizado. As médias obtidas no teste de crescimento de colônia, índice de velocidade de crescimento micelial, produção de conídios e transmissão foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Para analisar a influência das variáveis sobre a transmissão e índices de emergência e realizar o agrupamento dos isolados, foi realizada uma matriz de correlação e uma análise descritiva de componentes principais (ACP). A análise estatística foi realizada pelo software estatístico R (R CORE TEAM, 2020), as médias foram submetidas análise de variância (ANOVA) e teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resíduos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Amostragem e isolamento

Obteve um total de 49 isolados de *Fusarium* spp. infectando sementes de girassol (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes infectadas oito cultivares de girassol.

Espécie	Isolados (Código)	Cultivar
<i>F. pseudocircinatum</i>	F1	Aguará 04
<i>F. pseudocircinatum</i>	F2, F3	Olisun 3
<i>F. pseudocircinatum</i>	F4	Hélio 250
<i>F. fabacearum</i>	F5, F6	BRS 321
<i>F. fabacearum</i>	F7	Aguará 04
<i>F. fabacearum</i>	F8	Olisun 3
<i>F. fabacearum</i>	F9, F10	Hélio 250
<i>F. verticillioides</i>	F11	BRS G26
<i>F. verticillioides</i>	F12	BRS 321
<i>F. verticillioides</i>	F13	BRS 322
<i>F. verticillioides</i>	F14, F15, F16, F17	BRS 322
<i>F. verticillioides</i>	F18, F19, F20	GF 101
<i>F. verticillioides</i>	F21, F22, F23	Aguará 06
<i>F. verticillioides</i>	F24, F25, F26	Hélio 250
<i>F. proliferatum</i>	F27	BRS G26
<i>F. proliferatum</i>	F28, F29, F30	BRS 321
<i>F. proliferatum</i>	F31, F32	BRS 321
<i>F. proliferatum</i>	F33, F34, F35, F36, F37, F38	Aguará 04
<i>F. proliferatum</i>	F39, F40	GF 101
<i>F. proliferatum</i>	F41	Aguará 06
<i>F. proliferatum</i>	F42, F43, F44, F45, F46, F47	Olisun 3
<i>F. proliferatum</i>	F48, F49	Hélio 250

3.2. Análise filogenética

Este estudo representa a primeira tentativa de caracterizar espécies de *Fusarium* associadas sementes de girassol no Brasil usando uma abordagem filogenética e integrando morfologia, prevalência e transmissão. Neste estudo nos encontramos quatro espécies de *Fusarium* causando danos em sementes de girassol: *F. fabacearum*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum* e *F. verticillioides*.

A Análise preliminar da variação nucleotídica entre os 50 isolados usando sequências parciais da região EF1 revelou um total de 7 haplótipos (H1-H7). Quarenta e nove isolados (H1-H6) foram semelhantes às sequências do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi*

(FFSC) de acordo com o BLAST. Seis isolados (H7) foram similares às sequências de *F. fabacearum*.

Os isolados de *Fusarium* associados a sementes de girassol foram distribuídos entre três clados bem suportados em ambas as análises multilocus MV e BI e um clado suportado na análise BI. Dois isolados pertencem o complexo espécies *Fusarium oxysporum* (FOSC), sendo identificados como *F. fabacearum* suportado pela análise BI (Figura 1).

Dezoito isolados pertencem ao *Fusarium fujikuroi* (FFSC), sendo oito isolados identificados como *F. proliferatum*, formando clado com alto valor de suporte na maioria das árvores. Um isolado identificado como *F. pseudocircinatum* e nove isolados como *F. verticillioides*, ambos com clados suportados na análise multilocus e na maioria das árvores gênicas individuais (Figura 2).

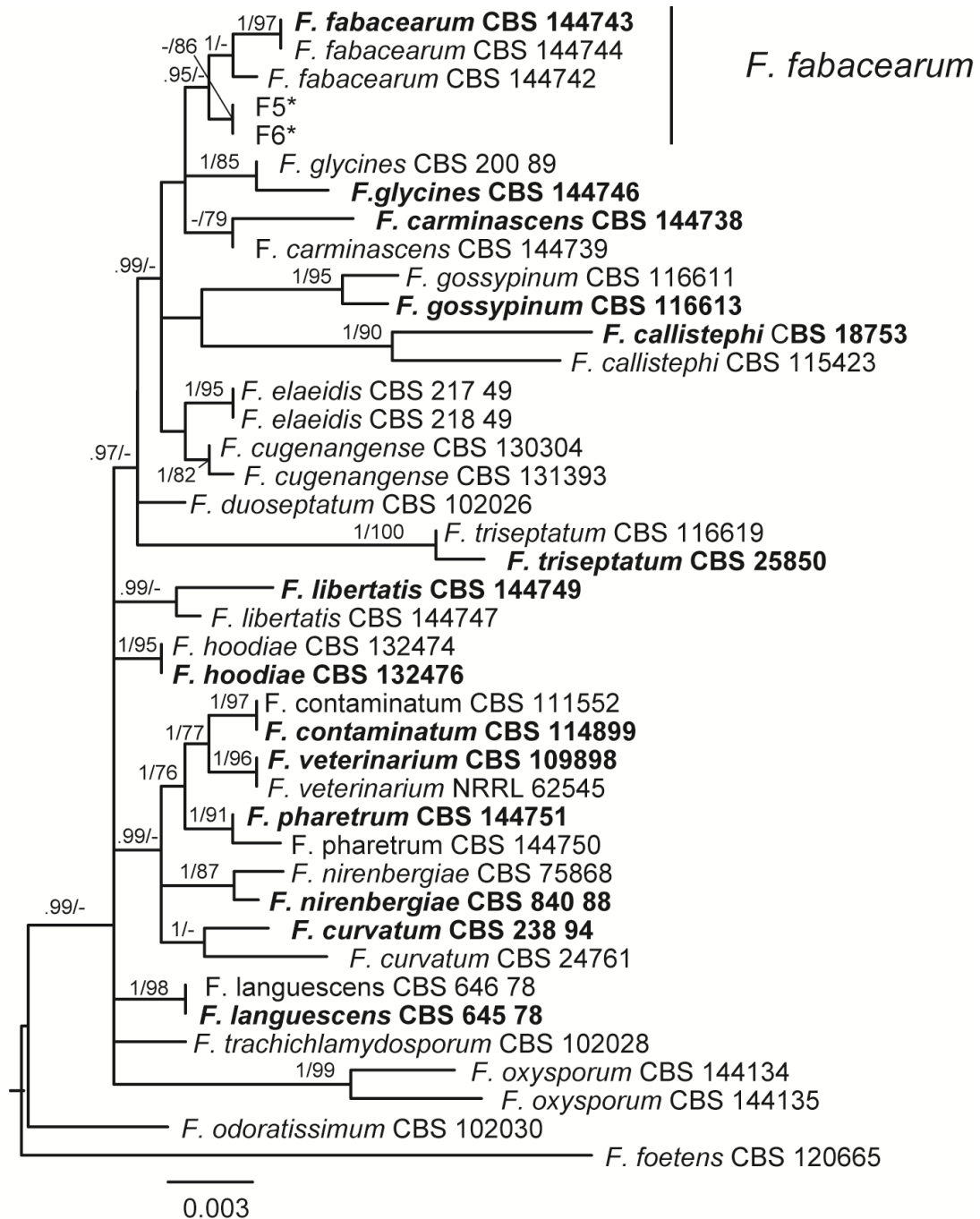


Figura 1. Árvore de máxima verossimilhança do complexo de espécies *Fusarium oxysporum* inferida a partir de um alinhamento concatenado de *tef1* e *TUB2*. Os valores de suporte de bootstrap ($MV \geq 70$) e os valores de probabilidade posterior bayesiana ($PP \geq 0.95$) são mostrados nos nós. "-" indica suporte não significativo. Ex-tipos são enfatizados em negrito. "*" Indica isolados de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). A árvore está enraizada pelo *midpoint*. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

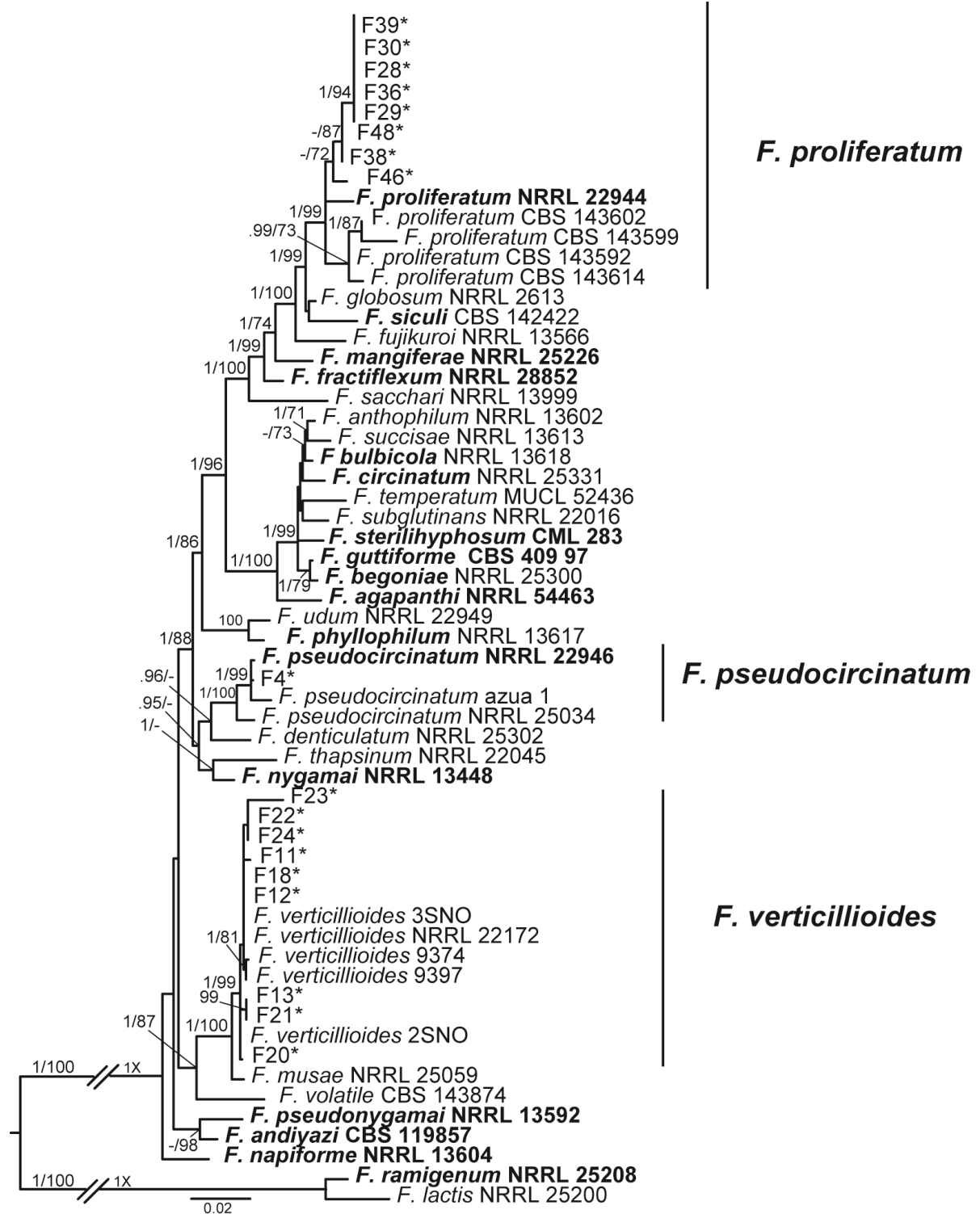


Figura 2. Árvore de máxima verossimilhança do complexo de espécies *Fusarium fujikuroi* inferida a partir de um alinhamento concatenado de *tef1* e *TUB2*. Os valores de suporte de bootstrap (MV ≥ 70) e os valores de probabilidade posterior bayesiana (PP ≥ 0.95) são mostrados nos nós. "-" indica suporte não significativo. Ex-tipos são enfatizados em negrito. "*" Indica isolados de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.). A árvore está enraizada pelo *midpoint*. A barra de escala indica o número estimado de substituições por site.

F. fabacearum pertence ao complexo de espécies de *F. oxysporum* e foi recentemente descrita por Lombard et al. (2019). As espécies desse complexo variam em especificidade do hospedeiro, adaptação ambiental e sintomatologia da doença (BELL et al., 2019). Snyder; Hansen (1940) inicialmente dividiram os isolados desse complexo, que causam murchas ou podridões das raízes, em grupos chamados *formae speciales* (f. sp.) com base na especificidade do hospedeiro.

Diante das dificuldades taxonômicas das espécies dentro do complexo *Fusarium oxysporum* (FOSC), Lombard et al., (2019) fizeram uma epitificação e nomearam 15 espécies dentro de FOSC através da análise filogenética multilocus a partir de quatro regiões genômicas (CmdA, Rpb2, Tef1 e Tub2) e diferenças morfológicas sutis utilizando um epitipo recentemente estabelecido de *F. oxysporum* como ponto de referência, estando *F. fabacearum* entre essas espécies.

F. proliferatum, *F. pseudocircinatum* e *F. verticillioides* são espécies pertencentes ao complexo *Fusarium fujikuroi* (FFSC). Membros do FFSC estão comumente envolvidos em doenças destrutivas de inúmeras plantas economicamente importantes, e são capazes de infectar sementes e/ou outros tecidos vegetais no campo, causando perdas significativas (WIGMANN et al., 2019).

A espécie *F. pseudocircinatum* é amplamente distribuída e ecologicamente diversa, sendo capaz de infectar uma ampla gama de hospedeiros. Essa espécie foi relatada causando podridões do caule em plantas de baunilha (*Vanilla planifolia*), na Indonésia (PINARIA et al., 2010), mortalidade de *Acacia koa* no Hawaii (SHIRAISHI, et al., 2012), Malformações em mangueira no México (FREEMAN et al. 2014) e na República Dominicana (GARCÍA-LÓPEZ et al., 2016) e na Austrália (LIEW et al., 2016). Além de causar brotações laterais e encurtamento de internós em mudas de mogno (*Swietenia macrophylla*) no México (SANTILLÁN- MENDOZA et al., 2018).

Fusarium verticillioides pode ser transmitido por sementes, causando redução significativa da germinação e emergência (FANTAZZINI et al., 2016) e infecção sistêmica em milho, bem como está associado com frequência a danos em grãos dessa cultura (GAI et al., 2018). Essa espécie é relatada causando danos na germinação e emergência de sementes de arroz (BASHYAL et al., 2016) e soja (PEDROSO et al., 2017). *Fusarium verticillioides*, quando inoculado em sementes de *Cordia americana*, causou tombamento em pré e pós-emergência, além de apodrecimento de raízes e necrose no hipocótilo (WALKER et. al., 2016).

Fusarium proliferatum é frequentemente associado à semente de milho (GUO et al., 2016). Quando inoculadas nas sementes girassol essa espécie causou 75% murcha nas plantas (SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2006) e foi responsável por podridão em sementes de feijão caupi (IGNJATOV et al., 2016). A transmissão por sementes dessa espécie foi observada por Guo et al. (2016) em trigo, resultando na colonização sistêmica das plantas e contaminação de grãos com as micotoxinas: fumonisinas e beauvericina. Elmer et al. (1999) relataram que isolados de *F. proliferatum* identificados na Austrália pode ser disseminado do através do transporte de sementes e coroas de aspargos (*Asparagus officinalis* L.) infectadas entre os países.

3.3. Análise morfológica dos isolados

Com relação às características morfológicas, o isolado de *F. pseudocircinatum* apresentou micélio aéreo, com pigmentação no meio e colônia com coloração laranja. Macroconídios retos ou ligeiramente falciformes, afinando em direção a ambas as extremidades, hialinos, apresentando de 3-5 septos e medindo 57,0 - 31,8 µm de comprimento e 4,5 - 3,7 µm de largura. Os microconídios formados em falsa cabeça, de formato oval, asseptado, medindo 8,3 - 6,3 µm de comprimento e 3,4 - 2,7 µm de largura. Presença de esporodóquio, sendo os mesmos esparsos e as células conidiogênicas formadas em monofialídes e/ou polifialídes curtas. Hifas estéreis raramente se formavam. Clamidósporos ovais, hialinos e lisos. (Tabela 2, Figura 3, Figura 4).

Os isolados identificados como *F. fabacearum* apresentaram micélio aéreo, com margens da colônia serrilhadas, pigmentação violeta, macroconídios levemente curvados, afinando em direção a ambas as extremidades, hialinos, apresentando 3-5 septos e medindo 41,1 - 22,1 µm de comprimento e 4,2 - 3,5 µm de largura. Os microconídios formados em falsas cabeças, de formato elipsoidal, sem septos e medindo 9,1 - 5,9 µm de comprimento e entre 2,2 e 1,4 µm de largura. Os esporodóquios formados abundantemente e as células conidiogênicas formadas em monofialídes, reduzidas a fiálides únicas e curtas. Presença de clamidósporos rugosos únicos formados terminalmente e em cadeia (Tabela 2, Figura 3, Figura 4).

Os isolados F11, F12, F13, F18, F20, F21, F22, F23, F24 e F28 de *F. verticillioides* desenvolveram micélio aéreo, cultura de coloração violeta, lilás, rosa claro, laranja ou laranja claro. Os macroconídios ligeiramente falcados e finos, sendo os mesmos típicos daqueles produzidos por espécies do complexo de espécies FFSC (LESLEI; SUMMERELL, 2006),

apresentando predominantemente de 3-5 septos e medição de 49,6 - 24,1 x 4,0 - 2,5 µm e ocasionalmente de 5 – 8 septos, medindo 71,4 - 35,4 x 4,2 - 1,5 µm. Os microconídios formados em falsas cabeças e/ou encontrados em cadeia apresentaram formato oval com base achatada, asseptados, medindo de 11,9 - 6,0 x 3,1 - 1,5 µm. Os esporodóquios esparsos e as células conidiogênicas formadas em monofialídes longas e em pares. Ausência de clamidósporos (Tabela 2, Figura 3, Figura 4).

Os isolados identificados como *F. proliferatum* apresentaram micélio aéreo abundante, inicialmente branco, se tornando posteriormente de coloração lilás, rosa claro, amarelo, amarelo claro e bege. Os macroconídios foram produzidos em grande número, relativamente retos, sendo os mesmos típicos das espécies do complexo FFSC (LESLEI; SUMMERELL, 2006) e apresentando de 3-5 septos, medindo entre 46,5 - 23,4 µm de comprimento e 5,1 - 1,9 µm de largura. Os microconídios formados em falsas cabeças ou em cadeia, de formato oval, asseptado, medindo entre 10,4 - 5,3 µm de comprimento e 4,1 - 1,5 µm de largura. Esporodóquios e clamidósporos não foram observados. Células conidiogênicas formadas em monofialídes e/ou polifialídes (Tabela 2, Figura 3, Figura 4).

Tabela 2. Caracteres morfológicos dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes infectadas de girassol (*Helianthus annuus* L.).

I	Coloração	Dimensões conidiais (µm)		Esporodóquio	Septação	Cl	Células conidiogênica		Disposição dos microconídios	
		Micro	Macro				Mono	Poli	Falsa cabeça	Cadeia
F4	Laranja	8,3 - 6,3 × 3,4 - 2,7	57,0 - 31,8 × 4,5 - 3,7	+	3 - 4	+	+	+	+	-
F5	Lilás	9,1 - 5,9 × 2,2 - 1,4	41,1 - 26,0 × 4,2 - 3,5	+	3 - 5	+	+	-	+	-
F6	Violeta	8,4 - 4,9 × 2,2 - 1,9	39,2 - 22,1 × 4,1 × 3,9	+	3 - 5	+	+	-	+	-
F11	Lilás	9,5 - 8,2 × 2,9 - 2,2	49,1 - 34,8 × 3,0 - 1,8	+	3 - 5	-	+	-	+	-
F12	Laranja claro	10,4 - 6,5 × 3,1 - 2,2	46,4 - 38,1 × 3,4 - 1,6	+	3 - 5	-	+	-	+	+
F13	Lilás	10,1 - 5,3 × 3,0 - 1,8	48,2 - 24,4 × 5,2 - 1,9	+	3 - 5	-	+	-	+	-
F18	Lilás	9,4 - 7,2 × 2,8 - 1,7	49,6 - 24,1 × 4,0 - 2,5	+	3 - 5	-	+	-	-	+
F20	Rosa claro	11,9 - 9,0 × 3,9 - 2,2	71,4 - 35,4 × 4,2 - 1,5	+	5 - 8	-	+	-	+	+
F21	Violeta	10,7 - 6,1 × 3,3 - 1,9	67,0 - 50,5 × 4,4 - 2,1	+	5 - 7	-	+	-	-	+
F22	Bege	10,4 - 4,6 × 3,2 - 1,7	39,2 - 28,1 × 4,4 - 2,2	+	3 - 5	-	+	-	-	+
F23	Violeta	9,5 - 8,6 × 3,4 - 2,8	55,0 - 27,1 × 4,6 - 1,9	+	5 - 6	-	+	-	+	-
F24	Rosa claro	11,9 - 6,0 × 3,1 - 1,5	45,6 - 24,0 × 4,0 - 2,8	+	3 - 5	-	+	-	+	-
F28	Amarelo claro	9,3 - 7,2 × 3,5 - 2,2	50,2 - 24,1 × 3,7 - 2,3	+	3 - 5	-	+	-	+	+
F29	Rosa claro	8,7 - 6,6 × 3,6 - 1,7	36,2 - 24,6 × 4,2 - 2,4	-	3 - 5	-	+	+	+	+
F30	Amarelo claro	9,2 - 8,0 × 2,0 - 1,9	42,5 - 34,4 × 4,1 - 2,3	-	3 - 5	-	+	+	+	+
F36	Amarelo claro	10,1 - 7,7 × 2,6 - 2,1	33,2 - 24,6 × 3,8 - 2,4	-	3 - 5	-	+	+	+	+
F38	Lilás	9,7 - 6,8 × 3,1 - 2,4	43,3 - 29,7 × 4,0 - 2,3	-	3 - 5	-	+	+	+	+
F39	Bege	10,4 - 5,9 × 2,5 - 1,9	46,5 - 25,0 × 5,1 - 2,5	-	3 - 5	-	+	+	+	+
F46	Rosa claro	9,6 - 6,1 × 4,1 - 2,7	41,9 - 23,4 × 4,1 - 1,9	-	3 - 5	-	+	+	+	+
F48	Amarelo	10,4 - 5,3 × 3,2 - 1,5	45,8 - 35,4 × 4,5 - 2,9	-	3 - 5	-	+	+	+	+

I – isolado, Cl – clamidósporos, Mono – monofialíde, Poli – polifialíde, FFSC - refere-se ao Complexo de espécies, ‘*Fusarium fujikuroi* Species Complex’, FOSSC - refere-se ao complexo de espécies, ‘*Fusarium oxysporum* Species Complex’. Presença (+), Ausência (-).

Os isolados de *Fusarium* foram altamente variáveis quanto a pigmentação sob condição de crescimento testadas (Figura 3).

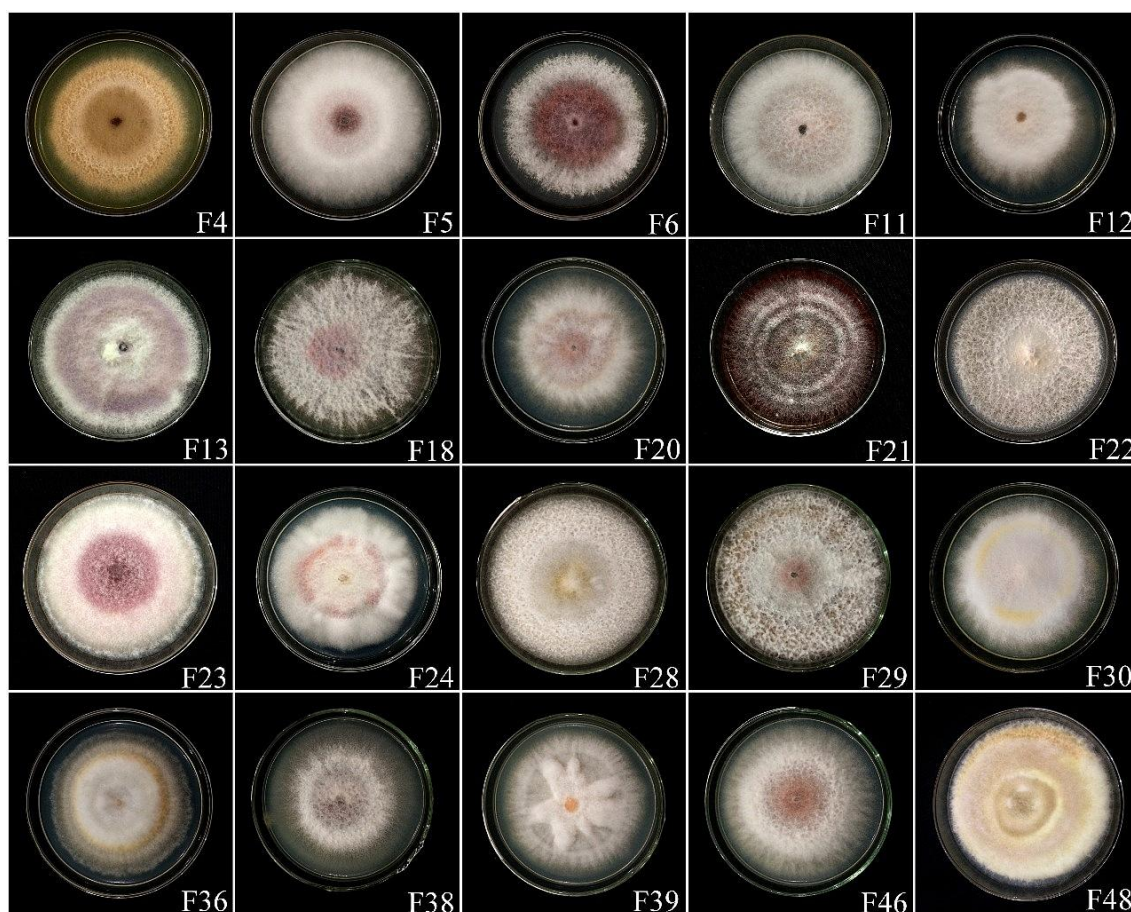


Figura 3. Coloração das colônias dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes infectadas de girassol (*Helianthus annuus* L.). crescidos em meio BDA. F4: *F. pseudocircinatum*; F5 e F6: *F. fabacearum*; F11, F12, F13, F18, F20, F21, F22, F23, F24 e F28: *F. verticillioides*; F29, F30, F36, F38, F39, F46 e F48: *F. proliferatum*.

Na Figura 4 é possível verificar a forma e o número de septos dos macroconídios de *F. pseudocircinatum* (Figura 4A), *F. fabacearum* (Figura 4B), *F. verticillioides* (Figura 4C e 4D) e *F. proliferatum* (Figura 4E), bem como outras estruturas desenvolvidas pelos fungos, como hifas estéreis no isolado F4 de *F. pseudocircinatum* (Figura 4F), células conidiogênicas formadas em monofialídes e polifialídes longas, desenvolvidas nos isolados de *F. pseudocircinatum* e *F. proliferatum* (Figura 4G), células conidiogênicas formadas em monofialídes longas observadas nos isolados de *F. verticillioides* (Figura 4H), células conidiogênicas formadas em monofialídes curtas observadas nos isolados *F. fabacearum* (Figura 4I) e a formação de clamidósporos nos isolados F4 de *F. pseudocircinatum* e F5 e F6 de *F. fabacearum* (Figura 4J, 4K e 4L).

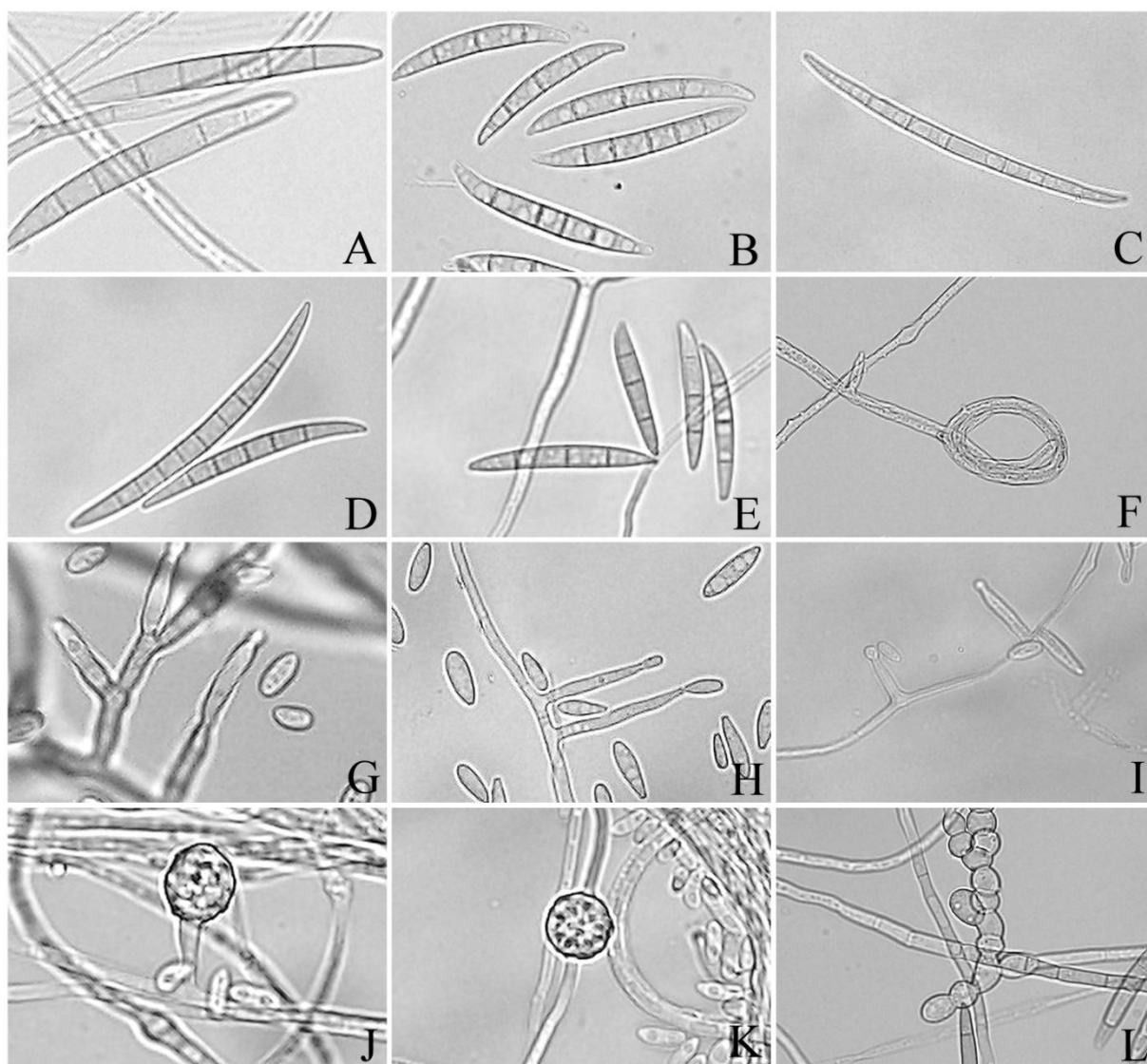


Figura 4. Características morfológicas dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos de sementes infectadas de girassol (*Helianthus annuus* L.). A. Macroconídio de *F. pseudocircinatum*; B. Macroconídio de *F. fabacearum*; C. Macroconídio de *F. verticillioides*; D. Macroconídio de *F. verticillioides*; E. Macroconídio de *F. proliferatum*; F. Hifas estéreis enroladas em *F. pseudocircinatum*; G. Conidióforo em polifiálide; H. Monofialídes longos com falsa cabeça; I. Monofialídes curtos com falsa cabeça; J. Clamidósporo verrucoso único na ponta das hifas (terminal); K. Clamidósporo verrucoso único e; L. Clamidósporos intercalar ou em cadeias. (Barra de escala = 20 μ m).

O IVCm variou de 2,6 cm.dia⁻¹ e 1,6 cm.dia⁻¹. O isolado F6 (*F. fabacearum*) apresentou os maiores IVCm, enquanto que o menor foi observado no isolado F38 (*F. proliferatum*). O diâmetro das colônias variou significativamente de 4,77 cm a 8,00 cm em meio BDA aos sete dias de cultivo. Observou-se que uma grande variação na capacidade de

produção de conídios entre os isolados das diferentes espécies de *Fusarium* analisadas, com valores de 28,1 conídios.mL⁻¹ a 1,4 conídios.mL⁻¹ (Figura 5).

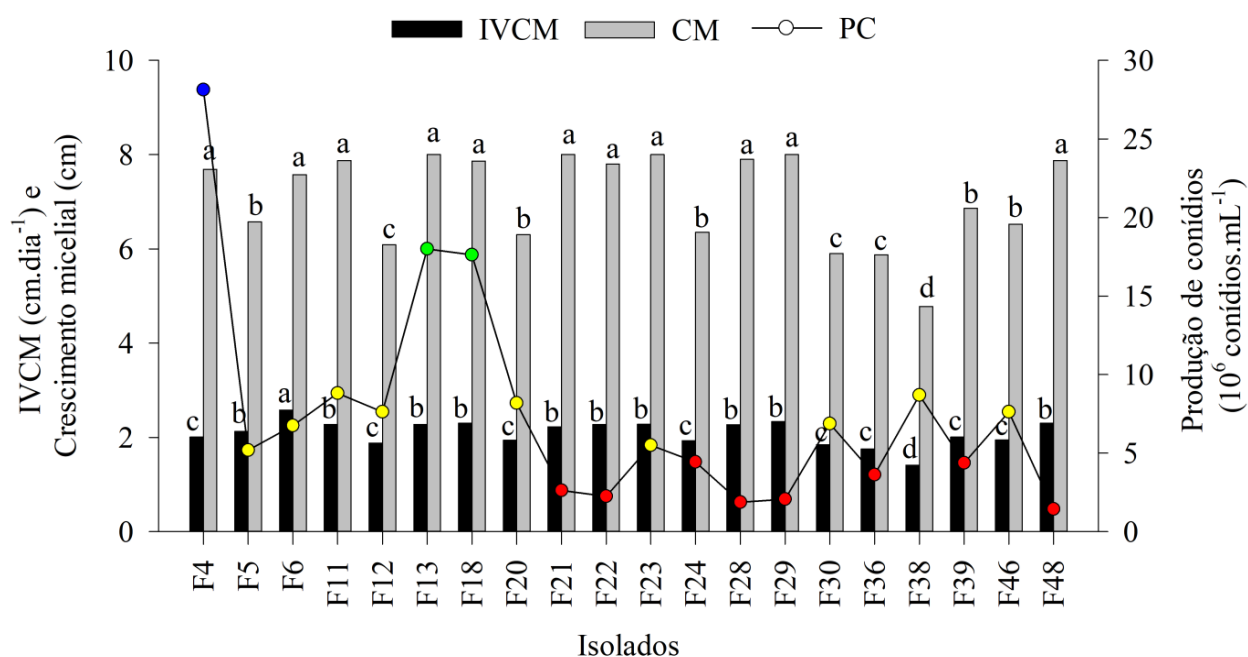


Figura 5. Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), crescimento micelial (CM) e produção de conídios (PC) de isolados de *Fusarium* spp. em de sementes infectadas de girassol (*Helianthus annuus* L.). F4: *F. pseudocircinatum*; F5 e F6: *F. fabacearum*; F11, F12, F13, F18, F20, F21, F22, F23, F24 e F28: *F. verticillioides*; F29, F30, F36, F38, F39, F46 e F48: *F. proliferatum*.

A maioria das características morfológicas das isolados pertencentes *F. pseudocircinatum* corroboram a literatura (LESLEI; SUMMERELL, 2006). Entretanto, algumas características não se assemelharam às descritas para as espécies desse complexo *Fusarium fujikuroi*, tais como, coloração de colônia, tamanho de macroconídios, diâmetro e velocidade de crescimento micelial em alguns isolados.

3.4. Prevalência de espécies de *Fusarium*

As espécies de *Fusarium* associadas a sementes de girassol diferem na prevalência total (Figura 6). *Fusarium proliferatum* foi a espécie mais abundante, representando 47% dos isolados obtidos. Enquanto que *F. pseudocircinatum* (8,1%) e *F. fabacearum* (12,2%) foram os menos prevalentes, estando restrito a três cultivares de girassol (Figura 6).

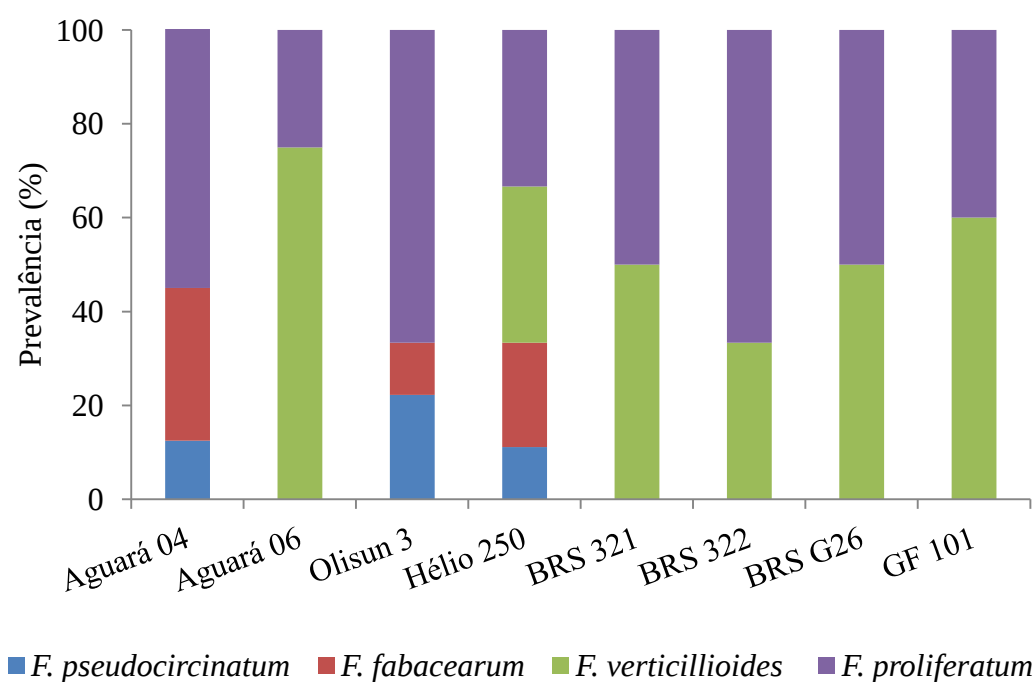


Figura 6. Prevalência de espécies de *Fusarium* associadas a sementes de diferentes cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.).

3.5. Transmissão semente-plântula de *Fusarium* spp.

As quatro espécies de *Fusarium* avaliadas (*F. pseudocircinatum*, *F. fabacearum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum*) foram patogênicas a cultura do girassol e transmitidas por sementes, sendo responsáveis por morte na pré ou pós-emergência em taxas diferentes, dependendo do isolado utilizado. Observou-se que 100% das plantas não inoculadas se mantiveram saudáveis durante o período de avaliação, demonstrando que os sintomas nas plantas ocorreram em decorrência da inoculação com *Fusarium* spp..

O crescimento de estruturas do patógeno foi verificado em sementes apodrecidas e plântulas sintomáticas (Figura 7A, 7B e 7C). Os sintomas observados foram podridão do colo e tombamento (Figura 7B), escurecimento vascular de plântulas (Figura 7D), subdesenvolvimento das plântulas infectadas (Figura 7E) e podridão das folhas cotiledonares (Figura 7F). Com o progresso da doença constatou-se a morte das plântulas sintomáticas.

A presente pesquisa mostra que o uso de sementes infectadas pode ocasionar danos significativos a essa cultura, resultando em apodrecimento das sementes e outros sintomas nas plantas, sendo a murcha a mais frequente.

De acordo com Chalam et al. (2020) o inóculo presente nas sementes é facilmente disseminado e introduzido em áreas isentas, podendo determinar o ciclo inicial da doença e infestar, de forma definitiva, o campo de cultivo. Com isso, a utilização de sementes com qualidade sanitária se constitui como um dos principais meios de reduzir disseminação e introdução de patógenos nos campos de cultivo (GAUR et al., 2020).

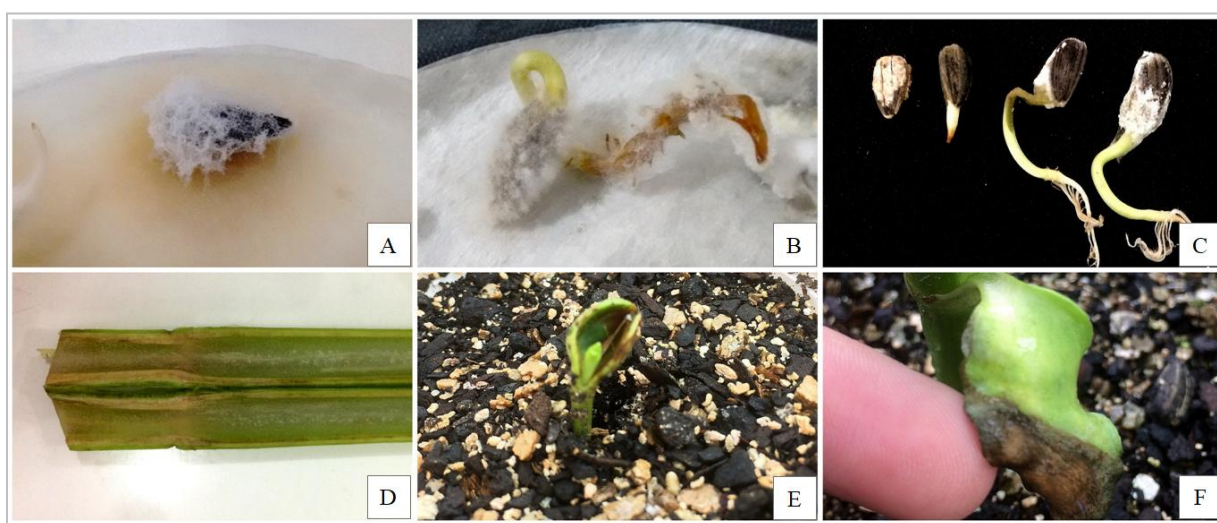


Figura 7. Sintomas de *Fusarium* spp. em sementes e plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.). A. Sementes deterioradas e com crescimento fúngico; B. Plântula com crescimento fúngico; C. Sementes e plântulas necrosadas; D. Corte longitudinal do caule com escurecimento vascular; E. Subdesenvolvimento de plântula; F. Podridão de folhas cotiledonares.

Espécies de *Fusarium* se associam às sementes de muitas culturas, causando perda de germinação, vigor e aumento de doenças nas plantas infectadas (MUKHTAR, 2009). No entanto, poucos são os relatos sobre a transmissão de *Fusarium* spp. a partir de sementes de girassol. Trabalhos pioneiros observaram sintomas como deterioração de sementes, podridão do colo, escurecimento vascular, murcha, subdesenvolvimento em plântulas ao inocular *F. anthophilum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, e *F. subglutinans*, *F. chlamydosporum* e *F. sporotrichioides* (SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2006) e *F. equiseti*, *F. longipes*, *F. scirpi*, *F. oxysporum*, *F. pallidoroseum*

e *F. solani* (SHARFUND-NAHAR; MUSHTAQ, 2007) via sementes. Os sintomas observados por esses autores foram semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

A germinação e sanidade das sementes foram avaliadas previamente à inoculação, sendo observada a germinação de 93% e 0% de incidência de *Fusarium* spp. nas sementes do lote da cv BRS 324 avaliada neste estudo, apresentando um padrão de qualidade para uso na realização do estudo de transmissão. Em casa de vegetação, no tratamento controle, observou-se 80% de emergência. As plântulas não apresentaram sintomas de doença e não foi detectado *Fusarium* spp. causando podridão nos 20% das sementes que não germinaram (Tabela 3).

Ao inocular as sementes com os 49 isolados de *Fusarium* spp., observou-se no ensaio de emergência, que um total de 30 isolados diferiram do tratamento controle, com valores de 55% a 70%??? e redução de emergência variando de 90,6% a 16,3% (Tabela 2). A inoculação com os isolados de *F. pseudocircinatum*, *F. fabacearum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* resultou em uma alta porcentagem de sementes não germinadas com *Fusarium* spp. (NCF), com valores de 16,3% a 84,7% de sementes apodrecidas. Para o isolado F9 de *F. fabacearum*, não foram detectadas plântulas com sintomas de doença, no entanto, observou-se alta porcentagem de sementes apodrecidas (63,8%) em decorrência da inoculação com esse isolado (Tabela 3).

Com relação à porcentagem de plântulas sintomáticas, 40 isolados diferiram do tratamento controle. Os isolados F6 de *F. fabacearum*, F13, F14, F15, F19 e F21 de *F. verticillioides*, F35, F41 e F47 de *F. proliferatum* foram os que apresentaram as maiores porcentagens de plântulas sintomáticas, com porcentagens que variaram de 47,7% a 69,0%. Já para as plântulas assintomáticas, todos os isolados de *F. pseudocircinatum* se mostraram menos virulentos, com porcentagens de plântulas assintomáticas de 97,0% a 86,3%, não diferindo do tratamento controle (Tabela 3).

Todos os isolados de *Fusarium* spp. foram patogênicos à cultivar BRS 324 de girassol e provocaram danos de pré e pós-emergência e os valores de taxa de transmissão e incidência total de doença variaram de 3,0% a 30,0% e 9,0% a 68,0%, respectivamente, com destaque para os isolados F13, F14, F19, F23, F24, F25 e F46 de *F. verticillioides* e F35, F36, F41 e F47 de *F. proliferatum*. Em 68% das plântulas sintomáticas, observou-se que os sintomas se desenvolveram progressivamente até o 15º dia pós-emergência (Tabela 3).

Tabela 3. Porcentagem de emergência (E), plântulas não emersas (NE), sementes não germinadas com *Fusarium* spp. (NCF), sementes não germinadas sem *Fusarium* spp. (NSF), plântulas sintomáticas (PS), plântulas assintomáticas (PA), taxa de transmissão (TT) e incidência total de doença (IT) no teste de transmissão de 49 isolados de *Fusarium* spp. em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.).

Espécie	I	Transmissão (%)							
		E	NE	NCF	NSF	PS	PA	TT	IT
Controle	T	80 a	20 c	0,0 c	100,0 a	0,0 d	100,0 a	0 e	0 d
<i>F. pseudocircinatum</i>	F1	64 b	36 b	60,5 a	39,5 c	9,2 d	90,8 a	10 d	26 c
<i>F. pseudocircinatum</i>	F2	67 b	33 b	48,2 b	51,8 b	4,5 d	95,5 a	3 e	19 c
<i>F. pseudocircinatum</i>	F3	69 b	31 b	48,2 b	51,8 b	3,0 d	97,0 a	8 e	15 c
<i>F. pseudocircinatum</i>	F4	70 b	30 b	72,1 a	30,1 c	13,7 c	86,3 a	17 d	28 c
<i>F. fabacearum</i>	F5	66 b	34 b	51,5 b	48,5 b	39,7 b	60,3 c	26 c	44 b
<i>F. fabacearum</i>	F6	70 b	30 b	40,5 b	59,5 b	47,7 a	52,3 d	32 c	45 b
<i>F. fabacearum</i>	F7	69 b	31 b	36,3 b	63,7 b	11,9 d	88,1 a	8 e	19 d
<i>F. fabacearum</i>	F8	68 b	32 b	71,2 a	28,8 c	36,5 b	63,5 c	24 c	47 b
<i>F. fabacearum</i>	F9	81 a	19 c	63,8 a	36,3 c	0,0 d	100,0 a	0 e	12 d
<i>F. fabacearum</i>	F10	64 b	36 b	56,4 a	43,6 c	22,2 c	77,8 b	15 d	36 b
<i>F. verticillioides</i>	F11	70 b	30 b	71,7 a	28,3 c	39,7 b	60,3 c	27 c	48 b
<i>F. verticillioides</i>	F12	80 a	20 c	49,8 b	50,2 b	22,2 c	77,8 b	18 d	27 c
<i>F. verticillioides</i>	F13	71 a	29 c	32,9 b	67,1 b	69,0 a	31,0 e	50 a	61 a
<i>F. verticillioides</i>	F14	65 b	35 b	80,6 a	19,4 c	57,3 a	42,7 d	37 b	65 a
<i>F. verticillioides</i>	F15	67 b	33 b	40,1 b	59,9 b	49,8 a	50,2 d	33 b	46 b
<i>F. verticillioides</i>	F16	71 a	29 c	51,4 b	48,6 b	41,1 b	58,9 c	29 c	44 b
<i>F. verticillioides</i>	F17	69 b	31 b	76,4 a	23,6 c	23,3 c	76,7 b	16 d	39 b
<i>F. verticillioides</i>	F18	75 a	25 c	37,3 b	62,7 b	35,4 b	64,6 c	26 c	35 c
<i>F. verticillioides</i>	F19	62 b	38 a	67,5 a	32,5 c	48,6 a	51,4 d	30 c	68 a
<i>F. verticillioides</i>	F20	62 b	38 b	67,5 a	32,5 c	34,4 b	65,6 c	21 c	47 b
<i>F. verticillioides</i>	F21	78 a	22 c	73,7 a	26,3 c	19,1 c	80,9 b	15 d	31 c
<i>F. verticillioides</i>	F22	68 b	32 b	41,7 b	58,3 b	20,1 c	79,9 b	13 d	27 c
<i>F. verticillioides</i>	F23	65 b	35 b	84,7 a	15,3 c	37,6 b	62,5 c	24 c	54 a
<i>F. verticillioides</i>	F24	77 a	23 c	90,6 a	9,4 c	39,6 b	60,4 c	31 c	51 a
<i>F. verticillioides</i>	F25	69 b	31 b	68,8 a	31,3 c	60,9 a	39,1 e	42 a	63 a
<i>F. verticillioides</i>	F26	55 b	45 b	74,2 a	25,8 c	6,8 d	93,2 a	4 e	37 b
<i>F. verticillioides</i>	F27	72 a	28 c	61,0 a	39,0 c	21,9 c	78,1 b	16 d	33 c
<i>F. proliferatum</i>	F28	68 b	32 b	16,3 c	83,8 a	19,3 c	80,7 b	14 d	20 d
<i>F. proliferatum</i>	F29	71 a	29 c	34,2 b	65,8 b	7,1 d	92,9 a	5 e	15 d
<i>F. proliferatum</i>	F30	77 a	23 c	21,7 c	78,3 a	4,0 d	96,1 a	3 e	9 d
<i>F. proliferatum</i>	F31	64 b	36 b	60,9 a	39,1 c	33,1 b	66,9 c	21 c	43 b
<i>F. proliferatum</i>	F32	72 a	28 c	48,2 b	51,8 b	42,1 b	57,9 c	28 c	44 b
<i>F. proliferatum</i>	F33	71 a	29 c	27,7 c	72,3 a	7,0 d	93,0 a	5 e	13 d
<i>F. proliferatum</i>	F34	75 a	25 c	29,8 c	70,2 a	36,0 b	64,0 c	27 c	34 c
<i>F. proliferatum</i>	F35	60 b	40 b	69,9 a	30,2 c	49,9 a	50,1 d	30 c	58 a
<i>F. proliferatum</i>	F36	70 b	30 b	72,9 a	27,1 c	44,5 b	55,5 d	31 c	52 a
<i>F. proliferatum</i>	F37	57 b	43 b	65,7 a	34,3 c	22,8 c	77,2 b	13 d	41 b
<i>F. proliferatum</i>	F38	67 b	33 b	40,1 b	59,9 b	35,4 b	64,6 c	24 c	37 b
<i>F. proliferatum</i>	F39	72 a	28 c	49,5 b	50,5 b	8,5 d	91,5 a	6 e	19 d
<i>F. proliferatum</i>	F40	74 a	26 c	19,4 c	80,6 a	20,1 c	79,9 b	15 d	20 d
<i>F. proliferatum</i>	F41	69 b	31 b	69,2 a	30,8 c	50,5 a	49,5 d	35 b	56 a
<i>F. proliferatum</i>	F42	75 a	25 c	58,9 a	41,1 c	33,5 b	66,5 c	25 c	39 b
<i>F. proliferatum</i>	F43	77 a	23 c	35,2 b	64,8 b	15,6 c	84,4 b	12 d	21 d

Cont. Tabela 3

<i>F. proliferatum</i>	F44	70 b	30 b	60,9 a	39,1 c	19,9 c	80,1 b	14 d	32 c
<i>F. proliferatum</i>	F45	72 a	28 c	67,4 a	32,6 c	41,8 b	58,2 c	30 c	49 b
<i>F. proliferatum</i>	F46	69 b	31 b	75,4 a	24,6 c	33,3 b	66,7 c	23 c	46 b
<i>F. proliferatum</i>	F47	74 a	26 c	60,5 a	39,5 c	49,9 a	50,1 d	37 b	53 a
<i>F. proliferatum</i>	F48	68 b	32 b	27,0 c	73,0 a	37,0 b	63,0 c	25 c	34 c
<i>F. proliferatum</i>	F49	72 a	28 c	67,0 a	33,0 c	27,7 c	72,3 b	20 c	38 b

Médias com letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0.05$). ISO = Isolados.

A ocorrência de microrganismos nas sementes não garante que o mesmo irá ocasionar problemas a determinada cultura, já que as sementes naturalmente abrigam uma grande diversidade dos mesmos. A existência de determinados microrganismos pode afetar a qualidade das sementes ou desenvolvimento e rendimento da cultura e, por fim, a produção. Com isso, estudos de transmissão desses patógenos são necessários para que se possa realizar o manejo adequado destes patógenos associados às sementes (SHADE et al., 2017).

Para *Fusarium* spp. em sementes de girassol, nenhum padrão sanitário foi estabelecido nos programas de certificação. No entanto, a alta incidência desse gênero em sementes, sob condições favoráveis, pode afetar a germinação das sementes e o desenvolvimento das plantas em campo, causando danos expressivos na cultura (MACHADO et al., 2013). A partir dos resultados do teste de transmissão, observa-se que o alto potencial de inóculo dos isolados de *Fusarium* spp. nas sementes de girassol, resultam em danos expressivos nas sementes e afeta o desempenho das plântulas.

Fungos vasculares, como *Fusarium* spp., que causam infecção sistêmica, geralmente apresentam alta taxa de transmissão em sementes associadas, alcançando facilmente o sistema vascular das plantas após a germinação, dependendo do genótipo utilizado (KARAJEH, 2006). Além do potencial direto da transmissão sobre a cultura, que provoca perdas econômicas nas áreas afetadas, as sementes contaminadas/infectadas com esse patógeno podem servir de veículo de disseminação local e em longas distâncias, servindo como inóculo inicial da doença em áreas isentas (SHADE et al., 2017).

Com base na análise de componentes principais (PCA) foi possível identificar quais variáveis analisadas apresentaram maior importância na caracterização dos isolados em relação aos diferentes níveis de virulência no teste de transmissão e o efeito na emergência das sementes dentro de cada componente. Os componentes principais

CP1 e CP2 apresentaram uma variação total de 59,45% e 23,87%, respectivamente, e a soma desses dois valores explicaram 83,32% da variação acumulada (Tabela 4).

As variáveis mais representativas na CP₁ foram sementes não germinadas com *Fusarium* spp. (NCF), plântulas sintomáticas, taxa de transmissão e incidência total de doença, apresentando autovalores iguais a 0,797; 0,819; 0,778 e 0,981. Já para CP2, a variável mais representativa foi a taxa de transmissão, com autovalores iguais a 0,625, sendo considerados bons indicadores na avaliação da patogenicidade dos 49 isolados de *Fusarium* spp. inoculados em sementes de girassol (Tabela 4).

De acordo com Silva et al. (2017), para cada componente principal, os valores de correlação iguais ou superiores a 0,6 são considerados relevantes e com poder discriminatório. Os resultados observados nesse estudo sugerem que em estudos futuros de transmissão, as variáveis sementes não germinadas com *Fusarium* spp. (NCF), porcentagem de plântulas sintomáticas, taxa de transmissão e incidência total de doença devem ser utilizadas na caracterização de isolados de *Fusarium* spp. em girassol.

Tabela 4. Contribuição das variáveis em cada eixo dos componentes principais nas variações dos índices de emergência das sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) infectadas por *Fusarium* spp..

Variáveis	Autovalores	
	CP1	CP2
Emergência (E)	-0,518	0,489
Não emersas (NE)	0,518	-0,489
Não germinadas com <i>Fusarium</i> sp. (NCF)	0,797	-0,452
Não emersas sem <i>Fusarium</i> sp. (NSF)	-0,798	0,451
Redução da emergência (RE)	0,797	-0,452
Plântulas sintomáticas (PD? OU PS?)	0,819	0,563
Plantas assintomáticas (PS)	-0,819	-0,563
Taxa de Transmissão (TT)	0,778	0,625
Incidência Total de doença (ID)	0,981	0,182
Autovalores	5,350	2,149
Variância acumulada (%)	59,45	23,87

Os isolados de *F. pseudocircinatum*, *F. fabacearum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* variaram em virulência e foram divididos em três grupos distintos, sendo classificados como alta, moderada e baixa virulência. A formação dos grupos mostrou claramente a diferença entre os isolados da mesma espécie (Figura 8).

Com base na incidência da doença, 20,4% dos isolados foram distribuídos no grupo classificado como de alta virulência, 57,1% dos isolados como de moderada virulência e 22,4% foram agrupados como baixa virulência (Figura 8).

Dos isolados estudados, os de *F. verticillioides* (F13, F14, F19, F23, F24 e F25) e *F. proliferatum* (F35, F36, F41 e F47) apresentaram uma alta virulência. A formação desse grupo está altamente correlacionada a uma elevada porcentagem de plântulas sintomáticas e alta taxa de transmissão pelas sementes. Um total de 28 isolados foi agrupado em moderada virulência, sendo essa classificação observada em isolados pertencentes a todas as espécies de *Fusarium* spp. que foram inoculadas nas sementes de girassol e 11 isolados foram agrupados em baixa virulência. A moderada virulência foi observada para os isolados F2 e F3 de *F. pseudocircinatum*, F7 e F9 de *F. fabacearum*, F28, F29, F30, F33, F39, F40 e F43 de *F. proliferatum* e está correlacionada a uma alta porcentagem de plântulas emersas assintomáticas e de sementes não germinadas sem *Fusarium* spp. (Figura 8).

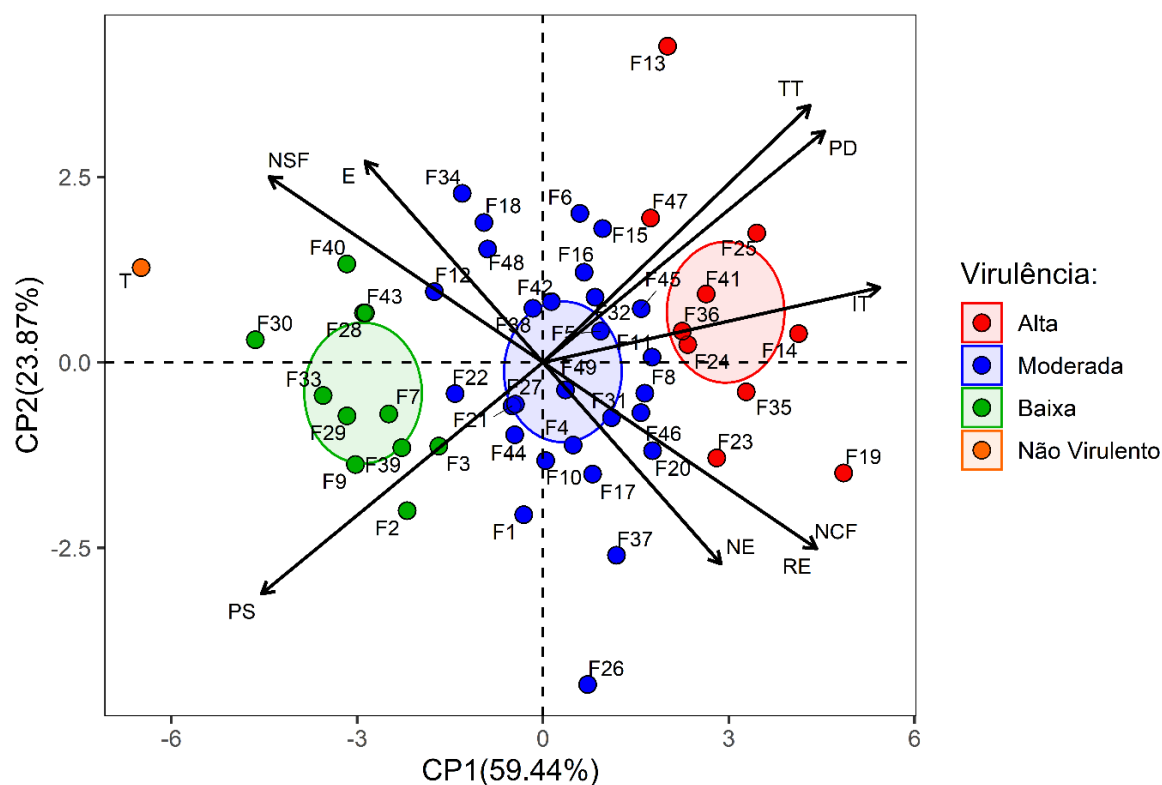


Figura 8. Análise de componentes principais (ACP) dos isolados de *Fusarium* spp. agrupados em diferentes níveis de patogenicidade em relação aos índices de germinação. Os elipses vermelho, azul, verde, e laranja representam a distância euclidiana do centroide no intervalo de confiança ($p < 0.05$). E = emergência, NE = Plântulas não emersas, NCF = sementes não germinadas com *Fusarium* spp., NSF = sementes não germinadas sem *Fusarium* spp., RE = redução de emergência, PS = plântulas sintomáticas, PA = plântulas assintomáticas, TT = taxa de transmissão e IT = incidência total de doença.

Essa variação no nível de virulência entre os diferentes isolados da mesma espécie, com a variação na capacidade dos isolados de causar doença é bem documentada para o gênero *Fusarium* spp. (HERRON et al., 2015). Além dos fatores ambientais (umidade ambiental e do solo, temperatura, vento, chuva e luz), práticas culturais (tipo de solo/substrato, pH, população de plantas, profundidade de semeadura e época de plantio, fertilização, entre outros) e vigor das sementes, a transmissão de um determinado patógeno das sementes para plântulas também está relacionada com a viabilidade e capacidade de sobrevivência do inóculo nas sementes (GARCIA JÚNIOR et al., 2008), podendo estas características diferirem de um isolado para outro.

A porcentagem de plântulas doentes correlacionou-se positivamente com porcentagem da taxa de transmissão ($r = 0,99$) e incidência total ($r = 0,91$) e correlacionou-se negativamente com plântulas sadias ($r = -1,00$). Para a variável plântulas sadias, também se observou uma correlação negativa para taxa de transmissão ($r = -0,99$) e incidência total ($r = -0,91$) (Figura 9).

Para emergência, constatou uma correlação negativa com porcentagem de plântulas não emersas ($r = -1,00$). Já o número de sementes não germinadas com *Fusarium* spp. (NCF) teve uma correlação positiva com redução de emergência ($r = 1,00$) e negativa com número de sementes não germinadas sem *Fusarium* spp. (NSF) ($r = -1,00$). O número de sementes não germinadas sem *Fusarium* spp. também se correlacionou negativamente com as variáveis redução de emergência ($r = -1,00$) e incidência total ($r = -0,68$). Com relação à incidência total, observou-se que a mesma se correlacionou positivamente com a taxa de transmissão ($r = 0,88$) e redução de emergência ($r = 0,68$) (Figura 9).

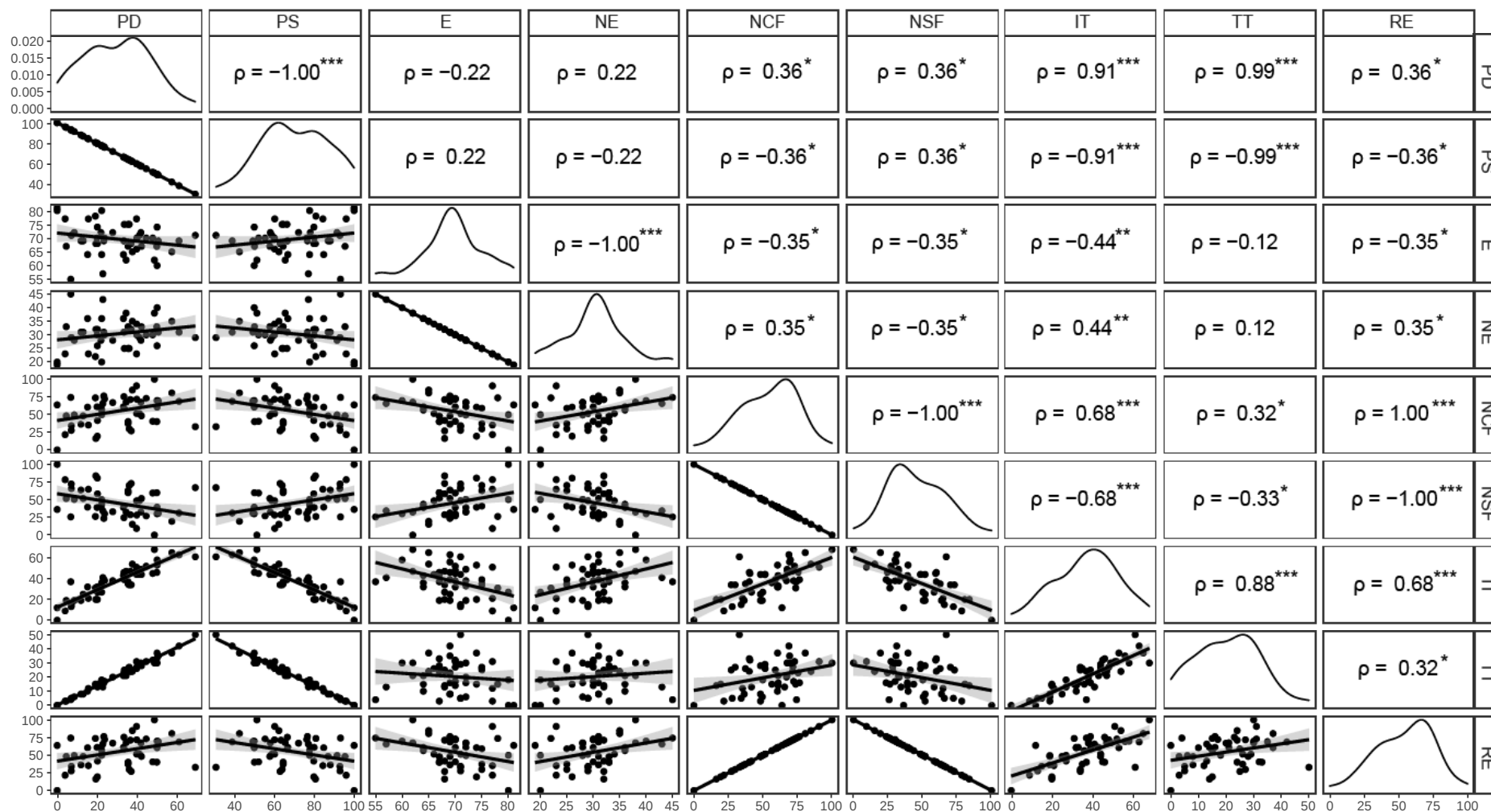


Figura 9. Matriz de correlação entre as variáveis de germinação em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) infectadas por *Fusarium* spp..

*, **, *** = Análise de correlação de Pearson significativo a $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ respectivamente. E = emergência, PS = plântulas sintomáticas, PA = plântulas assintomáticas, NE = plântulas não emersas, NCF = sementes não germinadas com *Fusarium* spp., NSF = sementes não germinadas sem *Fusarium* spp., IT = incidência total de *Fusarium* spp., TT = taxa de transmissão e RE = redução de emergência.

Os resultados indicaram que os isolados de *Fusarium* spp. inoculados nas sementes cv BRS 324 de girassol, afetaram as plantas direta e indiretamente, causando podridão nas sementes ou comprometendo as plântulas emersas, com alta taxa de transmissão e índices de doença.

Tem sido relatado que *Fusarium* spp. causa deterioração e impede o desenvolvimento radicular em sementes inoculadas (RAMOS et al., 2014). Em outro estudo, observa-se que não ocorre redução da germinação em sementes inoculadas por *F. graminearum*, no entanto, esse patógeno causa podridão das raízes e morte de plantas infectadas (YANG et al., 2011).

Com isso, pode-se afirmar que o uso de sementes de boa qualidade é um fator preponderante para o sucesso agrícola, uma vez que são consideradas um dos principais insumos agrícolas, que transporta para o campo todo o potencial genético da espécie, e, para que este se expresse, é necessário, dentre outros fatores, que possuam elevado potencial fisiológico e ausência de patógenos (RAMOS et al., 2014).

Lotes de sementes de girassol infectados por *Fusarium* spp., como *F. pseudocircinatum*, *F. fabacearum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum*, resultam em danos expressivos e podem desempenhar um papel significativo como fonte de inóculo para áreas isentas. Além do potencial de inóculo dessas espécies, a avaliação das condições ambientais e mais genótipos do hospedeiro são necessários para melhor estimar e compreender a relação dessas espécies com a cultura e as condições ideais de doença. Essas informações podem contribuir para o desenvolvimento de métodos mais precisos de controle de patógenos em sementes, bem como selecionar a resistência contra *Fusarium* spp..

4. CONCLUSÃO

Quatro espécies de *Fusarium* (*F. fabacearum*, *F. pseudocircinatum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum*) foram identificadas em sementes de girassol.

As espécies de *Fusarium* identificadas associadas às sementes de girassol apresentaram alta variação intraespecífica e morfológica.

Fusarium proliferatum foi o mais prevalente e está associada a todas as cultivares de girassol.

F. pseudocircinatum, *F. fabacearum*, *F. verticillioides* e *F. proliferatum* são patógenos da cultura do girassol e transmitidos via sementes.

As espécies de *Fusarium* spp. causam podridão de sementes, podridão do colo e tombamento, escurecimento vascular, subdesenvolvimento das plântulas infectadas, podridão das folhas cotiledonares e interferiram na emergência de plântulas de girassol.

REFERÊNCIAS

- ADDRAH, M. E.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; LIU, L.; ZHOU, H.; CHEN, W.; ZHAO, J. Fungicide treatments to control seed-borne fungi of sunflower seeds. *Pathogens*, v. 9, n. 29, p. 1-17, 2020.
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. 2. ed. Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. Ed. UFV. 2016. 516p.
- BASHYAL, B. M.; AGGARWAL, R.; SHARMA, S.; GUPTA, S.; RAWAT, K.; SINGH, D.; SINGH, A. K.; KRISHNAN, S. G. Occurrence, identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with bakanae disease of basmati rice in India. **European Journal of Plant Pathology**, v. 144, n. 2, p. 457-466, 2016.
- BELL, A. A.; GU, A.; OLVEY, J.; WAGNER, T. A.; TASHPULATOV, J. J.; PROM, S.; QUINTANA, J.; NICHOLS, R. L.; LIU, J. Detection and characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* VCG0114 (race 4) isolates of diverse geographic origins. **Plant disease**, v. 103, n. 8, p. 1998-2009, 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Manual de análise sanitária de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS. 2009. 200p.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 42, n. 225, p. 65-72, 1939.
- CATÃO, H. C. R. M.; AQUINO, C. F.; SALES, N. L. P.; SOARES, E. P. S.; CAIXETA, F.; MARTINEZ, R. A. S. Sunflower seeds quality stored in uncontrolled conditions, treated with hydrolats and vegetable extracts. **International Journal of Current Research**, v. 8, n. 9, p. 39295-39300, 2016.
- CHALAM, V. C.; DEEPIKA, D. D.; ABHISHEK, G. J.; MAURYA, A. K. Major Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: International Trade of Agricultural Products and Role of Quarantine. In **Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management**, Springer, Singapore. p. 25-61, 2020.
- ELMER, W. H.; SUMMERELL, B. A.; BURGESS, L. W.; NIGH JR, E. L. Vegetative compatibility groups in *Fusarium proliferatum* from asparagus in Australia. **Mycologia**, v. 91, n. 4, p. 650-654, 1999.
- FANTAZZINI, T. B.; GUIMARÃES, R. M.; CLEMENTE, A. D. C. S.; CARVALHO, E. R.; CRUZ MACHADO, J. *Fusarium verticillioides* inoculum potential and its relation with the physiological stored corn seeds quality. **Bioscience Journal**, v. 32, n. 5, p. 1254-1262, 2016.
- FREEMAN, S.; OTERO-COLINA, G.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S.; MAYMON, M.; PLOETZ, R. C.; AOKI, T.; O'DONNELL, K. First report of mango malformation disease caused by *Fusarium pseudocircinatum* in Mexico. **Plant Disease**, v. 98, n. 11, p. 1583-1583, 2014.

GAI, X.; DONG, H.; WANG, S.; LIU, B.; ZHANG, Z.; LI, X.; GAO, Z. Infection cycle of maize stalk rot and ear rot caused by *Fusarium verticillioides*. **PloS one**, v. 13, n. 7, e0201588, 2018.

GARCIA JÚNIOR, D.; VECHIATO, M. H.; MENTEN, J. O.; LIMA, M. I. P. Relação entre a incidência de *Fusarium graminearum* em sementes, emergência e ocorrência de giberela em plântulas de trigo. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 4, p. 302-308, 2008.

GARCÍA-LÓPEZ, E. L. V. I. S.; MORA-AGUILERA, J. A.; NAVA-DIAZ, C.; VILLEGAS-MONTER, A. N. G. E. L.; TOVAR-PEDRAZA, J. M.; SERRA, C.; BATISTA-MARTE, C. M. First report of *Fusarium pseudocircinatum* causing mango malformation disease in Dominican Republic. **Plant Disease**, v. 100, n. 7, p. 1501-1501, 2016.

GAUR, A.; KUMAR, A.; KIRAN, R.; KUMARI, P. Importance of Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Economic Losses and Impact on Society. In **Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management**, Springer, Singapore, p. 2-23, 2020.

GEISER, D. M.; JIMÉNEZ-GASCO, M.; DEL MAR.; KANG, S.; MAKALOWSKA, I.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. *Fusarium-ID* v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European journal of plant pathology**, v. 110, n. 5, p. 473-479, 2004.

GUO, Z.; PFOHL, K.; KARLOVSKY, P.; DEHNE, H. W.; ALTINCICEK, B. Fumonisin B1 and beauvericin accumulation in wheat kernels after seed-borne infection with *Fusarium proliferatum*. **Agricultural and Food Science**, v. 25, p. 2, p. 138-145, 2016.

HERRON, D. A.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D.; RODAS, C. A.; MARINCOWITZ, S.; STEENKAMP, E. T. Novel taxa in the *Fusarium fujikuroi* species complex from *Pinus* spp. **Studies in Mycology**, v. 80, p. 131-150, 2015.

IGNJATOV, M.; POPOVIĆ, T.; MILOŠEVIĆ, D.; VASIĆ, M.; NIKOLIĆ, Z.; TAMINDŽIĆ, G.; IVANOVIĆ, Ž. Occurrence, identification and phylogenetic analysis of *Fusarium proliferatum* on bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) in Serbia. **Ratarstvo i povrtarstvo**, v. 53, n. 2, p. 42-45, 2016.

JOHNSON, M.; ZARETSKAYA, I.; RAYTSELIS, Y.; MERZHUH, Y.; MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 2, p. W5-W9, 2008.

KARAJEH, M. R. Seed transmission of *Verticillium dahliae* in olive as detected by a highly sensitive nested PCR-based assay. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 45, n. 1, p. 15-23, 2006.

KARLSSON, I.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; DURLING, M. B.; KOLSETH, A. K.; STEINBERG, C.; PERSSON, P.; FRIEBERG, H. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, p. 491-501, 2006.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160-1166, 2019.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, 2013.

KEERIO, A.; NIZAMANI, Z. A.; HUSSAIN, S.; RAFIQ, M.; IQBAL, S.; KEERIO, A. Efficacy of some chemical fungicides against fusarium wilt of sunflower *in-vtro* condition couse by *Fusarium oxysporum*. International Journal of Botany Studies, v. 2, n. 5, p. 80-85, 2017.

KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J.; STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 1-21, 2009.

KOYYAPPURATH, S.; ATUAHIVA, T.; LE GUEN, R.; BATINA, H.; LE SQUIN, S.; GAUTHERON, N.; HERMANN, V. E.; JAHIEL, M.; STEINBERG, C.; LIEW, E. C. Y.; ALABOUVETTE, C.; BESSE, P.; DRON, M.; SACHE, I.; LAVAL, V.; GRISONI, M. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-vanillae* is the causal agent of root and stem rot of vanilla. **Plant Pathology**, v. 65, p. 612-625, 2016.

KUMAR, A.; GAUR, A.; GURJAR, M. S.; KUMARI, P.; KIRAN, R. Seed Health Testing and Seed Certification. In: **Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management**. Springer, Singapore, 2020. p. 795-808.

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

LIEW, E. C. Y.; LAURENCE, M. H.; PEARCE, C. A.; SHIVAS, R. G.; JOHNSON, G. I.; TAN, Y. P.; SUMMERELL, B. A. Review of *Fusarium* species isolated in association with mango malformation in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 45, n. 6, p. 547-559, 2016.

LOMBARD, L.; SANDOVAL-DENIS, M.; LAMPRECHT, S. C.; CROUS, P. W. Epitypification of *Fusarium oxysporum*—clearing the taxonomic chaos. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 43, n. 1-47, 2019.

LUSTRI, E. A.; SILVA, B. T.; PERUCHI, D. R. E.; MOURA, I. A.; FLUMINHAN, A. Avaliação do desempenho agrônômico de cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.) no cultivo em safrinha na região Oeste Paulista. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 13, n. 1, p. 37-51, 2017.

MACHADO, J. D. C.; MACHADO, A. Q.; POZZA, E. A.; MACHADO, C. F.; ZANCAN, W. L. A. Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 3, p. 213-217, 2013.

MUKHTAR, I. Sunflower disease and insect pests in Pakistan: A review. **African crop science journal**, v. 17, n. 2, p. 109-118, 2009.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; BURGESS, L. W. Characterization of *Fusarium-beomiforme* Sp - Nov. **Mycologia**, v. 79, p. 884-889, 1987.

NUNES, B. T.; PILON, A.; FLUMINHAN, A. Avaliação do desempenho agrônômico de genótipos de girassol (*Helianthus annuus* L.) cultivada na Região Oeste paulista e análise do rendimento de óleo, matéria seca e proteína bruta. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 9, n. 1, p. 150-165, 2013.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. **Evolutionary Biology Centre, Uppsala University**. 2004.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

OLIVEIRA, J. A. (1991). **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PINARIA, A. G.; LIEW, E. C. Y.; BURGESS, L. W. *Fusarium* species associated with vanilla stem rot in Indonesia. **Australasian Plant Pathology**, v. 39, n. 2, p. 176-183, 2010.

RAMBAUT, A. (2012). **FigTree v1.4.0: Tree Figure Drawing Tool**. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. (2010). **Tracer v. 1.4**. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed 15 march, 2019.

RAMOS, D. P.; BARBOSA, R. M.; VIEIRA, B. G. T. L.; PANIZZI, R. D. C.; VIEIRA, R. D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 1, p. 24-31, 2014.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, 2012.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, v. 19, p. 2496-2497, 2003.

SANTILLÁN-MENDOZA, R.; FERNÁNDEZ-PAVÍA, S. P.; O'DONNELL, K.; PLOETZ, R. C.; ORTEGA-ARREOLA, R.; VÁZQUEZ-MARRUFO, G.; RODRÍGUEZ-ALVARADO, G. A novel disease of big-leaf mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. **Plant disease**, v. 102, n. 10, p. 1965-1972, 2018.

SHADE, A.; JACQUES, M. A.; BARRET, M. Ecological patterns of seed microbiome diversity, transmission, and assembly. **Current opinion in microbiology**, v. 37, p. 15-22, 2017.

SHARFUND-NAHAR.; MUHAMMAD, M. Pathogenecity and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species (sec. Liseola and Sporotrichiella) in sunflower. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 487-492, 2006.

SHARFUND-NAHAR.; MUHAMMAD, M. (2007). Pathogenic effects and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species in sunflower. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 2, p. 645-649, 2007.

SHIRAISHI, A.; LESLIE, J. F.; ZHONG, S.; UCHIDA, J. Y. AFLP, pathogenicity, and VCG analyses of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium pseudocircinatum* from Acacia koa. **Plant disease**, v. 96, n. 8, p. 1111-1117, 2012.

SNYDER, W. C.; HANSEN, H. N. The species concept in *Fusarium*. **American Journal of Botany**, p. 64-67, 1940.

SOSA, M. V.; MACHADO, J. C.; KAWASAKI, V. H.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, A. A.; MARTINI NETO A. Methods of inoculation and effects of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton seeds. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 41-48, 2008.

SRINIVAS, A.; PUSHPAVATHI, B.; LAKSHMI, B. K. M.; SHASHIBHUSHAN, V. Detection of seed borne mycoflora of sunflower (*Helianthus annuus* L.). **The Pharma Innovation Journal**, v. 6, n. 9, p. 256-259, 2017.

STADEN, R.; BEAL, K. F.; BONFIELD, J. K. The Staden package. In: MISENER S.; KRAWETZ S. A (eds). **Bioinformatics methods and protocols**. Humana, p. 115-130, 1998.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1312-1313, 2014.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

VELOSO, J. S.; CÂMARA, M. P.; LIMA, W. G.; MICHEREFF, S. J.; DOYLE, V. P. Why species delimitation matters for fungal ecology: *Colletotrichum* diversity on wild and cultivated cashew in Brazil. **Fungal biology**, v. 122, n. 7, p. 677-691, 2018.

WALKER, C.; MACIEL, C. G.; MILANESI, P. M.; MUNIZ, M. F. B.; MEZZOMO, R.; POLLET, C. S. Caracterização morfológica, molecular e patogenicidade de *Fusarium acuminatum* e *Fusarium verticillioides* a *Cordia americana*. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 2, p. 463-473, 2016.

WIGMANN, É. F.; BEHR, J.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 13, p. 5323-5337, 2019.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; GAO, J.; ZHANG, G.; YU, Y.; ZHOU, W.; CHEN, W.; ZHAO, J. The Colonization Process of Sunflower by a Green Fluorescent Protein-Tagged Isolate of *Verticillium dahliae* and its Seed Transmission. **Plant Disease**, v. 102, p. 1772–1778, 2018.

CAPÍTULO III

MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE GIRASSOL COM *Trichoderma* sp. PARA CONTROLE DE *Fusarium proliferatum*

FARIAS, O. R. **Microbiolização de sementes de girassol com *Trichoderma* sp. para controle de *Fusarium proliferatum*.** (Doutorado em Agronomia). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB. 2020.

RESUMO

A murcha do girassol é ocasionada por diversas espécies de *Fusarium* e se constitui em uma ameaça a produção desta cultura. Para o manejo da doença, medidas preventivas devem ser adotadas, como a microbiolização de sementes com *Trichoderma* sp.. O controle biológico não oferece riscos a saúde do homem e ao meio ambiente e pode proporcionar aumento da produtividade. Esta pesquisa objetivou avaliar o potencial antagônico de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium proliferatum* e seu potencial no manejo da murcha na cultura do girassol. Foram utilizados sete isolados de *Trichoderma* sp. (TCH01, TCH02, TCH03, TCH04, TCH05, TCH06 e TCH07) no antagonismo a *F. proliferatum* (F32), obtidos por meio de sementes de girassol infectadas. Para testar o potencial antagônico de *Trichoderma* sp. sobre o patógeno, foram realizados testes de cultura pareada, antibiose e micoparasitismo. A sanidade das sementes de girassol inoculadas com patógeno e tratadas com o antagonista foi avaliada pelo método *Blotter test*. Também se avaliaram a germinação e emergência das sementes??? microbiolizadas. Em casa de vegetação, avaliaram-se a incidência, severidade, o comprimento da parte aérea, número de folhas, a massa fresca e seca da parte aérea e raízes e a atividade das enzimas peroxidase (POD), polifenoloxidase (PPO) e fenilalanina amônia liase (FAL) em plantas de girassol com 57 dias após a semeadura. Quanto ao controle de *F. proliferatum*, todos os isolados de *Trichoderma* sp. foram superiores ao tratamento controle. A produção de metabólitos voláteis é um mecanismo de ação comum a todos esses isolados. A microbiolização das sementes é eficiente na redução da incidência de *F. proliferatum* e na promoção do crescimento das plântulas de girassol. A incidência e severidade da murcha foram significativamente reduzidas nas plantas de girassol inoculadas com *Trichoderma* sp. via sementes. A indução de resistência foi observada com a atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia liase em plantas de girassol que receberam o tratamento com *Trichoderma* sp. via sementes, sendo todas relacionadas a defesa vegetal.

PALAVRAS-CHAVE: *Helianthus annuus* L.. Patologia de Sementes. Controle biológico.

FARIAS, O. R.. **Microbiolization of sunflower seeds with *Trichoderma* sp. for control of *Fusarium proliferatum*** (Doctorate in Agronomy). Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal da Paraíba. Areia, PB. 2020.

ABSTRACT

Sunflower wilt is caused by several species of *Fusarium* and the production of this culture constitutes a threat. For the management of the disease, preventive measures must be adopted, such as the microbiolization of seeds with *Trichoderma* sp.. Biological control does not pose risks to human health and the environment and can provide increased productivity. This research aimed to evaluate the antagonistic potential of *Trichoderma* sp. on *F. proliferatum* and its potential in the management of sunflower wilt. Seven isolates of *Trichoderma* sp. (TCH01, TCH02, TCH03, TCH04, TCH05, TCH06 and TCH07) in antagonism to *F. proliferatum* (F32), obtained through infected sunflower seeds. To test the antagonistic potential of *Trichoderma* sp. on the pathogen, paired culture, antibiosis and mycoparasitism tests were performed. The health of sunflower seeds inoculated with pathogen and treated with the antagonist was evaluated by the Blotter test method. The germination and emergence of microbiolized seeds were also evaluated. In the greenhouse, the incidence, severity, length of the aerial part, number of leaves, fresh and dry mass of the aerial part and roots and the activity of the enzymes peroxidase (POD), polyphenoloxidase (PPO) and phenylalanine ammonia lyase (FAL) were evaluated in sunflower plants 57 days after sowing. All isolates of *Trichoderma* sp. were superior to the control treatment in the control of *F. proliferatum*. The production of volatile metabolites is a mechanism of action common to all these isolates. The microbiolization of seeds is efficient in reducing the incidence of *F. proliferatum* and in promoting the growth of sunflower seedlings. The incidence and severity of wilt were significantly reduced in sunflower plants inoculated with *Trichoderma* sp. via seeds. Resistance induction was observed with the activity of the enzymes peroxidase, polyphenoloxidase and phenylalanine ammonia lyase in sunflower plants that received treatment with *Trichoderma* sp. via seeds, all of which are related to plant defense.

KEYWORDS: *Helianthus annuus* L.. Seed Pathology. Biological control.

1. INTRODUÇÃO

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma cultura amplamente cultivada em diversos países e destaca-se pelos múltiplos usos e amplo aproveitamento, podendo ser utilizada na produção de biodiesel, óleo comestível, silagem, farelo, mel, alimento para pássaros e, também, como planta ornamental (LUSTRI et al., 2017). Sua produtividade pode ser suprimida por patógenos como os do gênero *Fusarium* spp., agente causal da murcha vascular, constituindo-se em umas das principais ameaças em todos os estágios de desenvolvimento da cultura, sendo responsável por danos significativos (REN et al., 2015; KEERIO et al., 2017).

A ocorrência de *Fusarium* spp. em áreas cultivadas, mesmo em taxas relativamente baixas, pode resultar em perdas significativas na produção e produtividade. Este patógeno causa, apodrecimento do sistema radicular, amarelecimento, murcha de folhas e ramos, escurecimento vascular e morte das plantas infectadas (KEERIO et al., 2017). Além dos problemas pós-emergência nas plantas, também é responsável por ocasionar apodrecimento de cotilédones e lesões, seguidas de ruptura do hipocótilo, com redução significativa da germinação e do vigor das sementes e plântulas infectadas.

Espécies de *Fusarium* formam um grupo cosmopolita que pode sobreviver, ser facilmente disseminado e introduzido em áreas isentas por meio de sementes infectadas, determinando, assim, o ciclo inicial da doença e infestando, de forma definitiva, os campos de cultivo (SILVA FLÁVIO et al., 2014). Além disso, a complexidade do sistema do solo e a variabilidade genética do gênero *Fusarium*, tornam a doença de difícil controle (MILANESI et al., 2013).

A utilização do controle biológico de doenças tem se destacado frente aos fungicidas químicos, uma vez que esses produtos sintéticos são potencialmente perigosos para o meio ambiente e para o homem (HILLEN et al., 2012) e podem causar resistência dos organismos alvo advindos do uso inadequado, causando a perda da eficiência (LAZAROTTO et al., 2013). Ademais, o uso de fungicidas não é recomendado no manejo de murchas vasculares, uma vez que não controlam a infecção subsequente colonização do patógeno no floema (CARVALHO et al., 2011).

As espécies pertencentes ao gênero *Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales) estão amplamente disseminadas nos ecossistemas do solo e nas raízes das plantas (EL_KOMY et al., 2015). Esse antagonista pode suprimir doenças de plantas através de seus efeitos diretos sobre o patógeno com uma combinação de vários mecanismos, incluindo competição por

nutrientes e/ou espaço, antibiose associada à secreção metabólitos e micoparasitismo direto, envolvendo a produção de enzimas que degradam a parede celular (DINESH et al., 2018; FARIAS et al., 2020) ou pelos efeitos indiretos, com a capacidade de induzir a defesa das plantas contra os patógenos e promover o crescimento vegetal (ZEILINGER et al., 2016).

Além disso, *Trichoderma* spp. também são caracterizados por serem resistentes a substâncias tóxicas produzidas por outros microrganismos e tolerantes a diferentes tipos de fungicidas (DARYAEI et al., 2016). Vários estudos indicam que espécies de *Trichoderma* são agentes eficazes de biocontrole para *Fusarium*, via tratamento de sementes, de inúmeras culturas (FERRIGO et al., 2014; BABYCHAN; SIMON, 2017; XUE et al., 2017; FARIAS et al., 2019; SILVA et al., 2019).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi determinar o potencial de isolados de *Trichoderma* sp. no controle de *Fusarium proliferatum* e no manejo da murcha do girassol.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Localização experimental

Os experimentos foram conduzidos em condições de Laboratório de Fitopatologia e Casa de Vegetação, pertencente à Universidade Federal da Paraíba, Areia-PB, Brasil.

2.2. Obtenção e identificação de *Trichoderma* sp..

Os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados foram obtidos a partir de isolamento direto em sementes de diversas espécies vegetais e derivado de produto comercial (Tabela 1), sendo os mesmos identificados com auxílio de microscópio ótico, através de suas características morfológicas, auxiliados pela literatura especializada (SEIFERT et al., 2011).

Tabela 1. Origem dos isolados de *Trichoderma* sp..

Isolado	Origem	Local/ano de coleta
TCH01	Trichodel [®] – <i>Trichoderma asperellum</i>	–
TCH02	Sementes de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	Juarez Távora – PB/2015
TCH03	Sementes de jucá (<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. Ex Tul.var. <i>ferrea</i>)	Sumé – PB/2018
TCH04	Sementes de moringa (<i>Moringa oleífera</i> Lam.)	Sousa – PB/2017
TCH05	Sementes de feijão fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	Areia – PB/2016
TCH06	Sementes de leucena (<i>Leucaena leucocephala</i> Lam. de Wit.)	Areia – PB/2016
TCH07	Sementes de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Areia – PB/2017

2.3. Obtenção e identificação do isolado de *Fusarium proliferatum*

O isolado de *F. proliferatum* (F32) pertence à coleção de fungos fitopatogênicos do Laboratório de Fitopatologia (LAFIT), do Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB, Brasil, obtido a partir de sementes de girassol infectadas.

A identificação do patógeno foi realizada por meio da amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) de parte do gene do fator de alongamento (EF1) e parte do gene da β -tubulina 2 (tub2) usando os iniciadores Fa + 7 e Ra + 6 (KARLSSON et al., 2016), e T1 e Iniciadores T22 (O'DONNELL; ZELNIK, 1997), respectivamente. Após sequenciamento, identificou-se o agente causal como *F. proliferatum*. O sequenciamento foi realizado no Laboratory of Plant Virology and Laboratory of Mycology, do Mediterranean Institute for

Agriculture, Environment and Development, pertencente à Universidade de Évora, localizada em Évora, Portugal.

2.4. Origem das sementes de girassol

Foram utilizadas sementes de girassol, cv. BRS 324, safra 2017-2018, cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Algodão). As sementes foram beneficiadas manualmente, através de observação visual, descartando as mal formadas e atacadas por pragas (sementes parcial ou totalmente destruídas, com perfurações que atingiram o embrião).

2.5. Controle *in vitro* de *Fusarium proliferatum* com *Trichoderma* sp.

Para condução experimental, culturas puras obtidas de *F. proliferatum* e *Trichoderma* spp. foram multiplicadas em meio de cultura BDA e mantidas em câmara de incubação por oito dias, à temperatura de 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas.

2.5.1. Teste de pareamento de culturas

O teste do pareamento de culturas foi realizado através da metodologia de cultura pareada (DENNIS; WEBSTER, 1971). O patógeno foi repicado dois dias antes de cada isolado do antagonista, opostamente em cada placa de Petri, contendo meio de cultura BDA. As placas foram incubadas a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas. O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições (duas placas de Petri por repetição).

Após sete dias da repicagem de *Trichoderma* sp., foi realizada a classificação do agrupamento dos isolados do antagonista, de acordo com escala descrita por Bell et al. (1982), conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Escala de classificação de *Trichoderma* sp. proposta por Bell et al. (1982).

Classe	Ação do <i>Trichoderma</i> sp.
1	<i>Trichoderma</i> sp. cresce sobre o patógeno e ocupa toda a superfície do meio;
2	<i>Trichoderma</i> sp. cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio;
3	<i>Trichoderma</i> sp. ocupa aproximadamente metade da superfície do meio;
4	<i>Trichoderma</i> sp. cresce sobre 1/3 da superfície do meio;
5	<i>Trichoderma</i> sp. não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

2.5.2. Ação de micoparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium proliferatum*

Para avaliar o micoparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *F. proliferatum*, foram delimitados quatro quadrantes na parte inferior de placas de Petri (Ø 9 cm), contendo meio BDA com espessura de 3 mm. Em seguida, um pequeno fragmento, contendo colônia do patógeno, foi adicionado em uma das extremidades dos quadrantes e na outra extremidade foi adicionado fragmento contendo o antagonista, com distância aproximada de 1 cm.

As placas foram incubadas a 28 ± 2 °C por 24 horas até ocorrer o contato entre as hifas do patógeno e antagonista. Após o contato estabelecido, o meio foi cortado na camada limítrofe (entre o patógeno e o antagonista) e colocado em uma lâmina contendo lactofenol, sendo realizada a observação em microscópio ótico, modelo Olympus BX53, com fotografias registradas através da câmera Olympus DP73 através do programa cellSens Dimension em aumento de 20, 40 e 100x.

2.5.3. Ação de metabólitos voláteis de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium proliferatum*

Um disco da colônia do patógeno e um de cada antagonista, possuindo 5 mm de diâmetro cada, foi adicionado individualmente no centro do fundo de diferentes placas de Petri contendo meio BDA, sendo as placas ajustadas e vedadas com papel filme. As placas de Petri foram incubadas a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas, de forma que as bases superiores fossem aquelas com o patógeno. O delineamento foi inteiramente casualizado, utilizando-se quatro repetições, sendo cada repetição composta por 2 placas de Petri.

Durante sete dias foi realizada, diariamente, a medição do diâmetro das colônias de *F. proliferatum* com uma régua milimetrada, em dois eixos ortogonais, descartando-se o disco (5 mm de diâmetro cada) repicado da colônia pura, sendo posteriormente calculada a média. Esses dados foram utilizados no cálculo do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), a partir de fórmula apresentada por Oliveira (1991): $IVCM = \Sigma (D - D_a) / N$, sendo: IVCM= índice de velocidade de crescimento micelial; D= diâmetro médio atual da colônia; D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior; N= número de dias após a inoculação.

Com os dados de crescimento micelial também foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) do patógeno e a taxa de crescimento micelial, de acordo com as fórmulas apresentadas abaixo:

$PIC = (C - T / C) \times 100$, sendo: PIC = porcentagem de inibição; C = crescimento radial do patógeno (mm) sozinho (controle); T = crescimento radial do patógeno (mm) sobre a influência dos isolados de *Trichoderma* sp. (BASTOS, 1997).

Ao final do experimento foi realizada a contagem de conídios formados ao 7º dia de incubação. Para tal, em cada placa de Petri foram adicionados 10 mL de ADE. A suspensão foi filtrada em dupla gaze esterilizada e retirada uma alíquota de 10 µL e transferida para hemacitômetro, na qual foi feita a contagem de conídios ml^{-1} .

Com o número de conídios foi calculada a porcentagem de inibição da esporulação (PIE) de acordo com as fórmulas apresentadas abaixo: $PIE = (Etc - C / Etc) \times 100$, onde: PIE = porcentagem de inibição da esporulação; Etc = número de esporos do tratamento controle; C = número de esporos do patógeno sobre influência dos isolados de *Trichoderma* sp. (BASTOS, 1997).

2.6. Controle de *Fusarium proliferatum* em sementes tratadas com *Trichoderma* sp.

Para infestação das sementes de girassol, as mesmas foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (1% por 3min), lavadas com ADE e colocadas para secar em bandejas contendo papel filtro previamente esterilizado (BRASIL, 2009). As sementes foram inoculadas com *F. proliferatum* através do contato direto das sementes com a colônia do patógeno em placas de Petri contendo meio BDA + manitol com potencial osmótico ajustado para $-1,0$ MPa (SOUSA et al., 2008) e mantidas a 25 ± 2 °C por 48 horas.

Após inoculação do *F. proliferatum* nas sementes de girassol, as mesmas foram submetidas à microbiolização com os sete isolados de *Trichoderma* sp.. As sementes foram imersas nas suspensões de esporos dos antagonistas a $1,0 \times 10^7$ conídios/ ml^{-1} por 5 min, conforme descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Controle biológico com *Trichoderma* sp. utilizados em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) previamente inoculadas com *Fusarium proliferatum*.

Tratamentos
C - Controle (Sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min)
TCH01 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma asperellum</i> isolado de Trichodel®
TCH02 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de algodão
TCH03 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de jucá
TCH04 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de moringa
TCH05 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de feijão fava
TCH06 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de leucena
TCH04 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de arroz
F - Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes).

A ação da microbiolização das sementes sobre a incidência de *F. proliferatum* foi avaliada pelo *Blotter test* (BRASIL, 2009), utilizando 200 sementes, divididas em dez repetições de vinte sementes, sendo distribuídas individualmente em placas de Petri ($\varnothing$ 15 cm), sob condições assépticas, contendo dupla camada papel filtro, previamente esterilizada e umedecidas com 20 mL ADE. As placas foram mantidas por sete dias à 25 ± 2 °C.

Procedeu-se a visualização e identificação de *F. proliferatum* nas sementes através de descrições de morfologia e por meio de literatura especializada (SEIFERT et al., 2011), com o auxílio de microscópios ótico. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem de incidência do fungo.

2.7. Testes de germinação e emergência em sementes de girassol microbiolizadas com *Trichoderma* sp.

Para avaliar a influência dos agentes biocontroladores sobre a qualidade fisiológica, sementes de girassol, cv. BRS 324, foram submetidas aos tratamentos previamente descritos na Tabela 3.

Após microbiolização das sementes, foram realizados os testes de germinação e emergência, conforme Brasil (2009), utilizando-se 200 sementes por tratamento, distribuídas em quatro repetições de 50 sementes.

2.7.1. Teste de germinação

No teste de germinação, as sementes foram distribuídas em substrato de papel *Germitest*[®], previamente esterilizado e umedecido com a quantidade de ADE equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Após semeadura, os papéis foram dispostos em formas de rolos, alocados em sacos plásticos transparentes e acondicionados em câmara de germinação *Biological Oxygen Demand* (BOD), regulada a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas.

As contagens de sementes germinadas foram realizadas diariamente do 4º ao 10º dia, contabilizando-se as plântulas normais (raízes e hipocótilo).

A primeira contagem de germinação foi conduzida conjuntamente com o teste de germinação, computando-se as sementes germinadas no 4º dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi conduzido em conjunto com o teste de germinação, efetuando-se contagens diárias das sementes germinadas. O índice foi

determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962): $IVG = (G_1 + G_2 + G_3 + \dots + G_n) / (N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_n)$, sendo: IVG = índice de velocidade de germinação; G_1 , G_2 e G_n = número de sementes germinadas no primeiro, segundo e último dia; N_1 , N_2 e N_n = número de dias decorridos da semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O comprimento e a massa seca das plântulas foram realizados após o teste de germinação. Com o auxílio de uma régua graduada, foram avaliados o comprimento de parte aérea e raízes das plântulas normais, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula (cm.plântula^{-1}).

Posteriormente, foi determinada a massa seca da parte aérea e sistema radicular sendo colocadas em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação forçada de ar à temperatura de $65 \pm 2^\circ\text{C}$, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula^{-1} .

2.7.2. Teste de emergência

O teste de emergência foi realizado em casa de vegetação e as sementes foram semeadas em copos plásticos com dimensões de 4,1 x 5,2 cm, contendo areia lavada, previamente autoclavada por duas vezes ($1,0 \text{ kgf/cm}^2$ à 120°C por 60 min, com intervalo de 24 h entre autoclavagens), cuja manutenção da umidade foi realizada por meio de duas regas diárias.

Para o teste de emergência, o critério de avaliação utilizado foi emissão dos cotilédones acima do substrato do 4º ao 10º dia, sendo os resultados em porcentagem. A primeira contagem de emergência também foi conduzida conjuntamente com o teste de emergência, computando-se as plântulas emersas no 4º dia após a semeadura (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de emergência foi conduzido em conjunto com o teste de emergência, sendo observado diariamente o número de plântulas emersas. O índice foi determinado de acordo com a fórmula proposta por Maguire (1962): $IVE = (G_1 + G_2 + G_3 + \dots + G_n) / (N_1 + N_2 + N_3 + \dots + N_n)$, sendo: IVE = índice de velocidade de germinação; G_1 , G_2 e G_n = número de plântulas emergidas no primeiro, segundo e último dia; N_1 , N_2 e N_n = número de dias decorridos da semeadura à primeira, segunda e última contagem.

O comprimento e a massa seca das plântulas foram realizados no final do teste de emergência. Com o auxílio de uma régua graduada, foram mensurados o comprimento de

parte aérea e raízes das plântulas normais, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula (cm.plântula^{-1}).

Posteriormente, foi determinado a massa seca da parte aérea e o sistema radicular sendo colocadas em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65 ± 2 °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula^{-1} .

2.8. Teste de colonização endofítica

O teste de colonização endofítica foi realizado com objetivo de avaliar a presença de *Trichoderma* sp. no interior de órgãos e tecidos de plântulas de girassol, como raízes, caules e folhas. Para tanto, aos 21 dias após a emergência, cinco plântulas de cada tratamento foram lavadas em água e, de cada plântula foram retirados três fragmentos de ± 1 cm das raízes, do caule e das folhas.

O material foi desinfestado e em seguida disposto em placas de Petri, contendo o meio de cultura BDA, as quais foram mantidas em câmara de incubação por cinco dias, à temperatura de 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, com auxílio de um microscópio estereoscópico foi verificada a presença (+) ou ausência (-) de *Trichoderma* sp. nas diferentes amostras.

2.9. *Trichoderma* sp. no manejo da murcha vascular causada por *Fusarium proliferatum* através do tratamento de sementes

Para ensaios com infecção das sementes de girassol foram realizados ensaios em casa de vegetação. As sementes foram previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio (1% por 3min), lavadas com ADE e colocadas para secar em condição ambiente (25 °C). As sementes foram inoculadas com *F. proliferatum* através do contato direto das sementes com a colônia do patógeno em placas de Petri contendo meio BDA + manitol com potencial osmótico ajustado para $-1,0$ MPa (SOUSA et al., 2008) e mantidas por 48 horas, a 25 °C e 12 horas de fotoperíodo.

Após inoculação com *F. proliferatum* as sementes de girassol foram submetidas a microbiolização com sete isolados de *Trichoderma* sp.. Para o tratamento das sementes, estas

foram imersas nas suspensões de esporos do antagonista na concentração de $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹ por 5 min, conforme descritos na Tabela 3 do item 2.7.

Tabela 4. Controle biológico com *Trichoderma* sp. utilizado em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.).

Tratamentos
1C - Controle Positivo (Sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min)
2C - Controle Negativo (Sementes inoculadas com <i>F. proliferatum</i> e não tratadas com <i>Trichoderma</i> sp..)
TCH01 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma asperellum</i> isolado de Trichodel [®]
TCH02 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de algodão
TCH03 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de jucá
TCH04 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de moringa
TCH05 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de feijão fava
TCH06 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de leucena
TCH07 - Sementes inoculadas com <i>Trichoderma</i> sp. isolado de sementes de arroz
F - Inoculadas com <i>F. proliferatum</i> e tratadas com fungicida Captana (240g/100 kg de sementes).

Após tratadas e inoculadas com *F. proliferatum*, as sementes foram distribuídas em vasos com capacidade de 5,5 L, a uma profundidade de 2 cm, contendo substrato comercial Brasplant[®] e vermiculita (2:1 v/v) esterilizada. Os vasos permaneceram em casa de vegetação durante 50 dias, com temperatura oscilando de 28 a 32 °C durante o dia e de 18° a 20 °C durante a noite, com rega manual, duas vezes ao dia. O delineamento foi inteiramente casualizados, utilizando-se quatro repetições, sendo cada repetição compostas por três plantas.

A incidência da doença foi avaliada após o transplântio, sendo contabilizada a presença ou ausência de sintomas, e a porcentagem foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: Incidência (%) = (Total de plantas sintomáticas/Total de plantas) x 100.

A avaliação da severidade foi realizada aos 50 dias após a inoculação avaliando-se sintomas externos e internos, com base em escala de notas variando de 0-5, sendo 0 para plântulas sadias (sem sintomas foliar e vascular); 1 ao observar sintomas iniciais de murcha (amarelecimento) e descoloração vascular; 2 ao observar 25% das folhas com murcha e descoloração vascular extensa até o primeiro par de folhas; 3 ao observar até 50% das folhas com murcha e descoloração vascular até metade da haste; 4 ao observar até 75% das folhas com murcha e descoloração vascular até metade da haste e; 5 ao observar plantas mortas.

Após avaliação da severidade da doença, foi determinado o índice de severidade da doença (ISD), de acordo com a fórmula proposta por Ooi (2002): $ISD = [\sum(\text{Número da escala} \times \text{Número de plântulas nessa escala}) / (\sum(\text{Número de plântulas tratadas} \times \text{Maior valor de classificação da escala}) \times 100]$

Aos 57 DAS, também realizou-se a medição do comprimento da parte aérea, contagem do número de folhas, massa fresca e seca de parte aérea e raízes. As medições do comprimento da parte aérea foram realizadas com auxílio de uma régua graduada, sendo os resultados expressos em centímetros por plântula (cm.plântula⁻¹).

Para determinação da massa verde da parte aérea e o sistema radicular das plântulas, as mesmas foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001g sendo os resultados expressos em g.plântula⁻¹. Foi determinada a massa seca da parte aérea e o sistema radicular sendo colocadas em sacos de papel Kraft e levadas para estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65 ± 2 °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula⁻¹.

A massa fresca e seca da parte aérea e do sistema radicular foram colocadas em sacos de papel Kraft e levados para estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65 ± 2 °C, até a obtenção de peso constante, por 48 horas. Decorrido esse período foram pesados em balança analítica com precisão de 0,001g e os resultados expressos em g.plântula⁻¹.

2.10. Atividade enzimática induzida por *Trichoderma* sp. em plantas de girassol

As atividades enzimáticas foram determinadas 30 dias após a inoculação de *Trichoderma* sp. nas plantas de girassol, analisando-se as enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase. A extração do material foi realizada através da maceração de 1 g de folhas em 10 mL de acetato de sódio, até obter-se uma massa homogenia, depositada em eppendorf e centrifugada a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade enzimática e foi realizada a quantificação das proteínas totais pelo método proposto por Bradford (1976).

2.10.1. Atividade da Fenilalanina Amônia-liase (FAL)

A atividade foi determinada pela quantificação do ácido trans-cinâmico liberado a partir da fenilalanina, que consiste na adição de 0.5 mL de extrato, 1.5 mL de tampão Tris-HCl (100 mM) (pH 8,8), 0.5 mL de fenilalanina (100 mM) e 0.5 mL de ADE em eppendorf (1,5 mL), sendo incubado à 40 °C por 60 min. A reação foi paralisada com a adição de 0.1 mL de ácido clorídrico (5,0 M). A leitura foi realizada em cubeta de quartzo no espectrofotômetro por

meio de variação na absorbância em comprimento de onda 290 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína.

2.10.2. Atividade da Peroxidase (POD)

Determinada através da adição de 0.25 mL de extrato enzimático ao meio de reação em eppendorf (1.5 ml) contendo 0.25 mL de guaiacol (1,7%), 0.75 mL de tampão fosfato 0.1 M (pH 6,0). e 0.25 mL de H₂O₂ (1,8%). A atividade enzimática foi observada em espectrofotômetro, pela variação da absorbância, no comprimento de onda de 470 nm à 25 °C, com a leitura realizada imediatamente após preparo da reação e resultados expressos em U.A/min./mg de proteína.

2.10.3. Atividade da Polifenoloxidase (PPO)

Realizada através da conversão de catecol em quinona, com adição de 0.25 mL de S-metil-catecol 0.6 mM, 0.75 µL do tampão fosfato de sódio 0.1 M (pH 6,8) e 0.25 µL de extrato. As amostras foram incubadas a 40 °C durante 15 min e a reação paralisada com adição de 0.8 mL de ácido perclórico. A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro, pela variação da absorbância, no comprimento de onda de 395 nm, a 25 °C e resultados expressos em U.A/min./mg de proteína.

2.11. Delineamento e análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC). Os resultados obtidos foram avaliados pelo software estatístico R (R CORE TEAM, 2020). As médias foram submetidas a análise de variância e comparadas pelo teste de Scott-Knott (p <0,05).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Controle *in vitro* de *Fusarium proliferatum* com *Trichoderma* sp.

3.1.1. Teste de pareamento de culturas

Detectou-se ação antagônica dos isolados de *Trichoderma* sp. sobre *F. proliferatum*, sendo observado que, no teste de confronto direto, os isolados TCH01, TCH02, TCH03 e TCH04 foram agrupados na classe 2, ou seja, o antagonista ocupou pelo menos 2/3 da superfície do meio. Os isolados TCH05, TCH06 e TCH07 de *Trichoderma* sp. após entrarem em contato com patógeno, continuaram em crescimento, ocupando totalmente a colônia, sobre as quais produziram conídios em abundância, sendo os mesmos agrupados na classe 1 (Tabela 5 e Figura 1).

Tabela 5. Classificação dos isolados de *Trichoderma* sp. quanto ao antagonismo exercido sobre *Fusarium proliferatum*.

Isolados	Classe*
TCH01	2a
TCH02	2a
TCH03	2a
TCH04	2a
TCH05	1b
TCH06	1b
TCH07	1b
CV (%)	3,06

*Classificação em conformidade com a escala de Bell et al. (1982).

Segundo Mbarga et al. (2012); Ferrigo et al. (2020) a primeira etapa para avaliação da capacidade antagonista de *Trichoderma* sp. é a caracterização do potencial desses microrganismos, que são realizados através de estudos *in vitro*. Xue et al. (2017) também sugerem que testes *in vitro* devem ser utilizados, quando se deseja testar um grande número isolados de *Trichoderma* sp.. Com base nos resultados iniciais obtidos no teste de pareamento, observa-se que todos os isolados de *Trichoderma* sp. avaliados podem ser utilizados como biocontroladores contra *F. proliferatum* no girassol. As classes de antagonismo ficaram entre 1,0 e 2,0, tornando-os eficientes no controle desse patógeno com potencial de utilização em casa de vegetação e em campo (Tabela 5).

Morfologicamente, os isolados de *Trichoderma* sp. impediram o crescimento excessivo do patógeno e esporularam intensamente sobre a colônia do mesmo (Figura 2B e 2C). Resultados semelhantes foram observados por Carvalho et al. (2011) com três isolados de *T. harzianum*, sobre *F. oxysporum*.

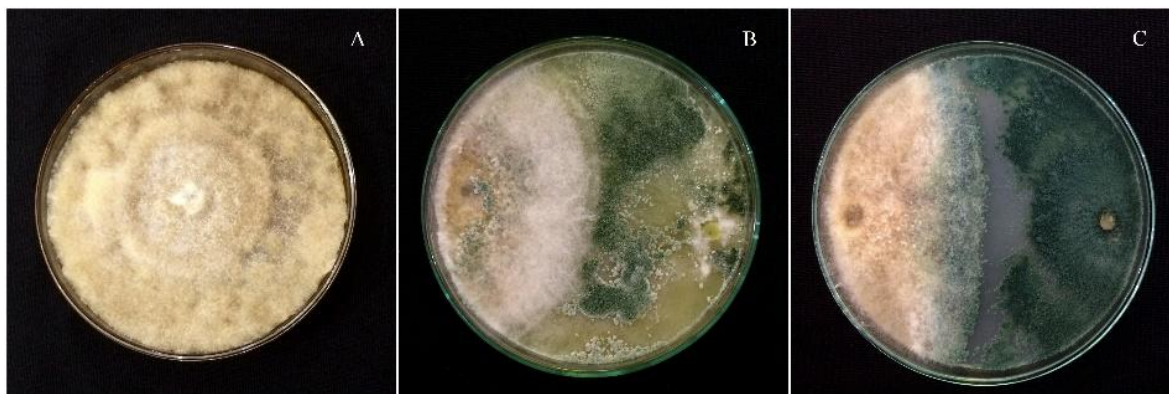


Figura 1. Antagonismo de *Trichoderma* sp. contra *Fusarium proliferatum* após o teste de confronto direto. A: Crescimento micelial rápido e esporulação densa de *F. proliferatum*; B: *Trichoderma* sp. crescendo sobre o patógeno e ocupando toda a superfície do meio; C: *Trichoderma* sp. crescendo sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio.

Segundo Dinesh et al. (2018) os compostos produzidos por *Trichoderma* spp, pode suprimir doenças de plantas através de seus efeitos antagônicos diretos sobre o patógeno, principalmente com a produção de enzimas líticas, como quitinases e β -1,3-glucanases. Esse mecanismo antagônico apresenta a capacidade de hidrolisar a parede celular do patógeno, limitando assim o seu crescimento (EL_KOMY et al., 2015; CONINCK et al., 2020).

Essas substâncias produzidas pelos antagonistas não são essenciais para o seu crescimento, mas desempenham funções importantes nos processos redução do crescimento dos organismos presentes no mesmo ambiente (MACHELEIDT et al., 2016). Esses compostos são geralmente de baixo peso molecular, difusíveis no meio de cultura ou voláteis, que são sintetizados por uma grande variedade de vias metabólicas, sendo a síntese geralmente diferente entre as linhagens e influenciada pelas condições de crescimento (RAMÍREZ-VALDESPINO et al., 2019).

3.1.2. Ação de micoparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium proliferatum*

Nas observações microscópicas, o patógeno mostrou morfologia hifal anormal e ruptura do micélio nas áreas de interação com os isolados de *Trichoderma* sp.. A redução do crescimento de *F. proliferatum* também foi atribuída ao micoparasitismo direto (Figura 2).

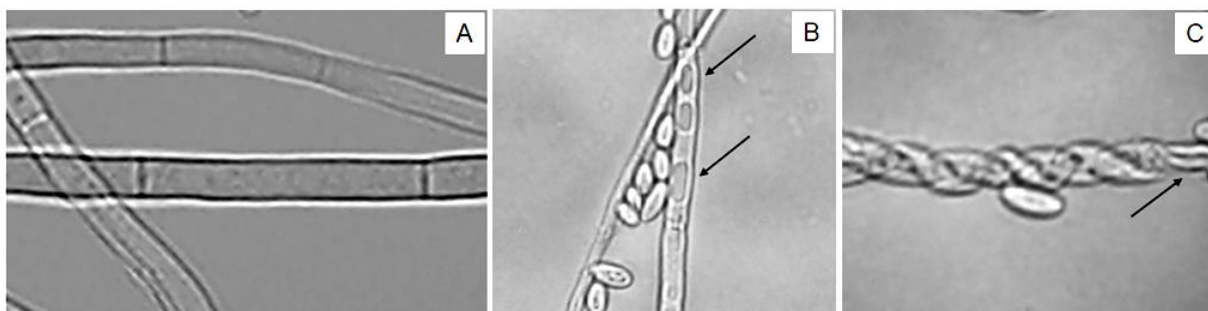


Figura 2. Antagonismo de *Trichoderma* sp. contra *Fusarium proliferatum* após o teste de confronto direto. A: Hifas saudáveis de *Fusarium proliferatum*; B: Vacuolização/ruptura celular; C: Enrolamento/estrangulamento de hifas.

Segundo Millanesi et al. (2013) esse é um dos principais mecanismos utilizados pelo antagonista em testes de biocontrole. Esse micoparasitismo de *Trichoderma* contra *Fusarium* sp. já foi relatado para *T. harzianum* e *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (CARVALHO et al., 2014), *Trichoderma* sp. e *F. sambucinum* (MACIEL et al., 2014), *T. harzianum* e *F. graminearum* (XUE et al., 2017), *Trichoderma* sp. e *F. subglutinans* (SILVA et al., 2019).

3.1.3. Ação dos metabólitos voláteis de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium proliferatum*

Pelo teste de antibiose, observou-se ação dos metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp., sendo todos eficientes na redução do crescimento micelial e IVCN de *F. proliferatum*, quando comparados ao tratamento controle, com melhores resultados observados para TCH01, TCH02, TCH05, TCH06 e TCH07 (Tabela 6).

Os isolados de *Trichoderma* sp. afetaram significativamente a taxa de crescimento micelial e esporulação de *F. proliferatum*, sendo observando que no tratamento controle, o crescimento micelial foi de 14,2 mm dia⁻¹ e a esporulação de 59,25 conídios/mL⁻¹. Sobre influência dos metabólitos voláteis, os menores valores para crescimento micelial do patógeno foram para TCH05 e TCH06, com médias de 5,7 e 6,2 mm dia⁻¹, respectivamente. Para esporulação, os melhores resultados foram evidenciados para TCH05, TCH06 e TCH07, com valores médios de 2,5; 1,7 e 1,2 de conídios/mL⁻¹, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Ação dos metabólitos voláteis de *Trichoderma* sp. sobre o crescimento micelial (CM), índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM), taxa de crescimento micelial (TX) e número de esporos de *Fusarium proliferatum*.

Tratamentos	CM (mm)	IVCM	TX (mm.dia ⁻¹)	NE (conídios/ml ⁻¹)
Controle	85,0a	0,87a	14,2a	59,2a
TCH01	39,6d	0,47c	6,6d	10,0c
TCH02	38,4d	0,46c	6,4d	6,5c
TCH03	45,2c	0,51b	7,5c	9,5c
TCH04	50,5b	0,55b	8,3b	13,0b
TCH05	35,0d	0,41c	5,7e	2,5d
TCH06	37,0d	0,44c	6,2e	1,7d
TCH07	40,0d	0,48c	6,7d	1,2d
CV(%)	4,20	2,50	4,09	18,60

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade.

Com relação à porcentagem de inibição do crescimento micelial, TCH05 e TCH06 apresentaram diferença significativa, sendo superiores aos demais isolados testados, reduzindo em 58,8% e 56,2% o crescimento do patógeno, respectivamente. Para a inibição da esporulação, os melhores resultados foram evidenciados por TCH05, TCH06 e TCH07, com valores de 95,7%, 97,04% e 97,8%, respectivamente (Figura 3A e 3B).

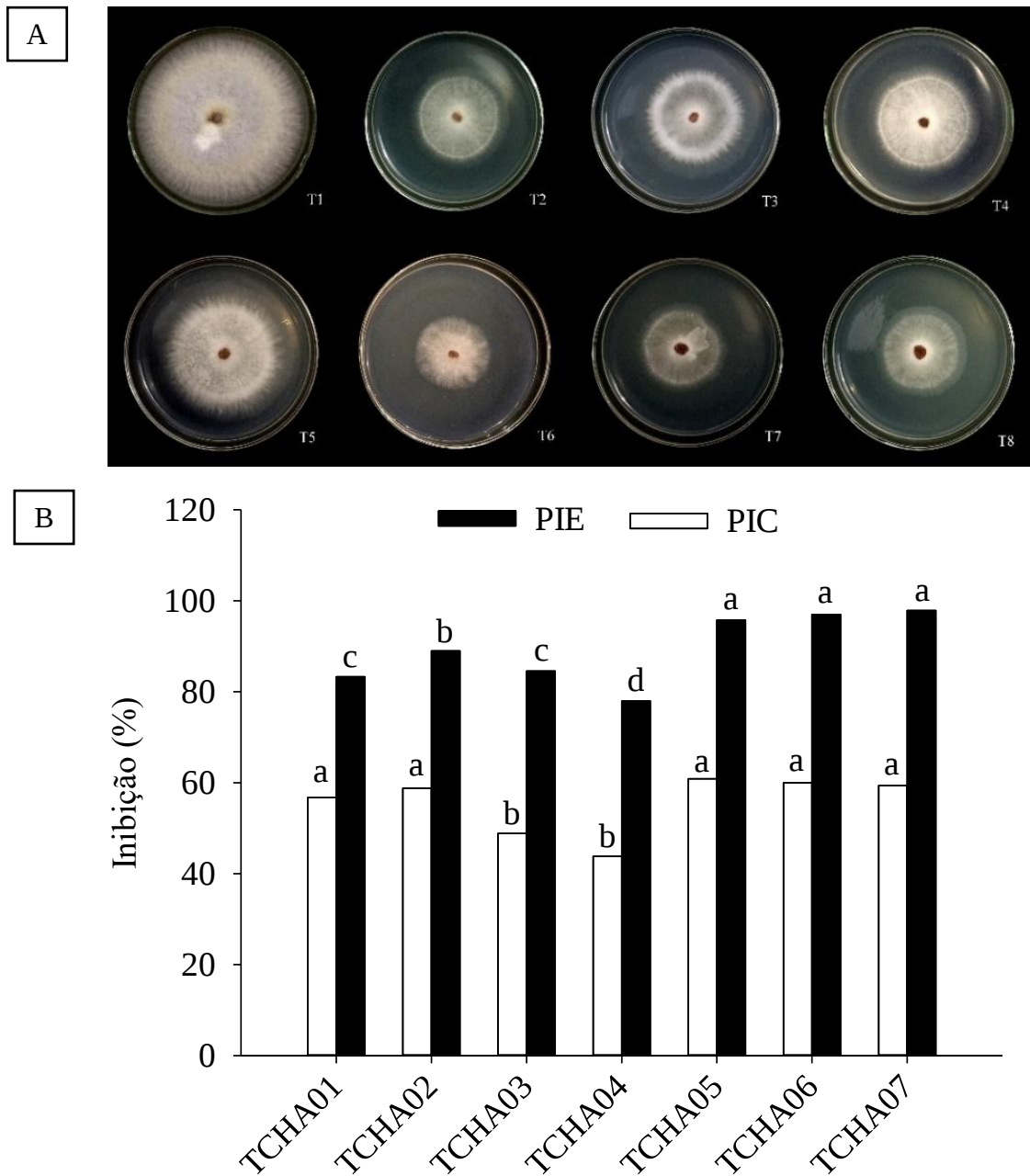


Figura 3. A. Crescimento micelial de *Fusarium proliferatum* após ação dos metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* sp.; B. Efeito inibidor de metabólitos voláteis de *Trichoderma* sp. sobre porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e inibição da esporulação (PIE) de *Fusarium proliferatum*. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). T1 – Controle; T2 – TCH01 (*Trichoderma asperellum* isolado de Trichodel[®]); T3 – TCH02; T4 – TCH03; T5 – TCH04; T6 – TCH05; T7 – TCH06; T8 – TCH07.

Os metabólitos voláteis produzidos pelo *Trichoderma* sp. são substâncias com ação tóxica, que possuem a capacidade de reduzir ou mesmo paralisar (efeito fungistático) o crescimento e a esporulação do patógeno (BOMFIM et al., 2010). E o efeito dessas substâncias antifúngicas também foram relatadas por Xue et al. (2017), com redução de

53,2% a 81,1% do crescimento micelial de *F. graminearum* pela ação dos metabólitos voláteis de 22 isolados de *Trichoderma* sp. após 6 dias de incubação. Sá et al. (2019) também observaram redução de 37,8% das colônias de *Fusarium* sp. em função da ação inibitória dos metabólitos produzidos por *Trichoderma* sp..

3.2. Controle de *F. proliferatum* em sementes microbiolizadas com *Trichoderma* sp.

Nas sementes de girassol, cv. BRS 324, microbiolizadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp., houve redução significativa da incidência de *F. proliferatum* com a utilização de todos os isolados antagônicos, sendo que os mais eficientes foram TCH03, TCH06 e TCH07, com redução da incidência em torno de 90, 96 e 94%, respectivamente, quando comparada com tratamento controle, e os mesmos não diferiram do fungicida, cuja redução foi 96% (Figura 4).

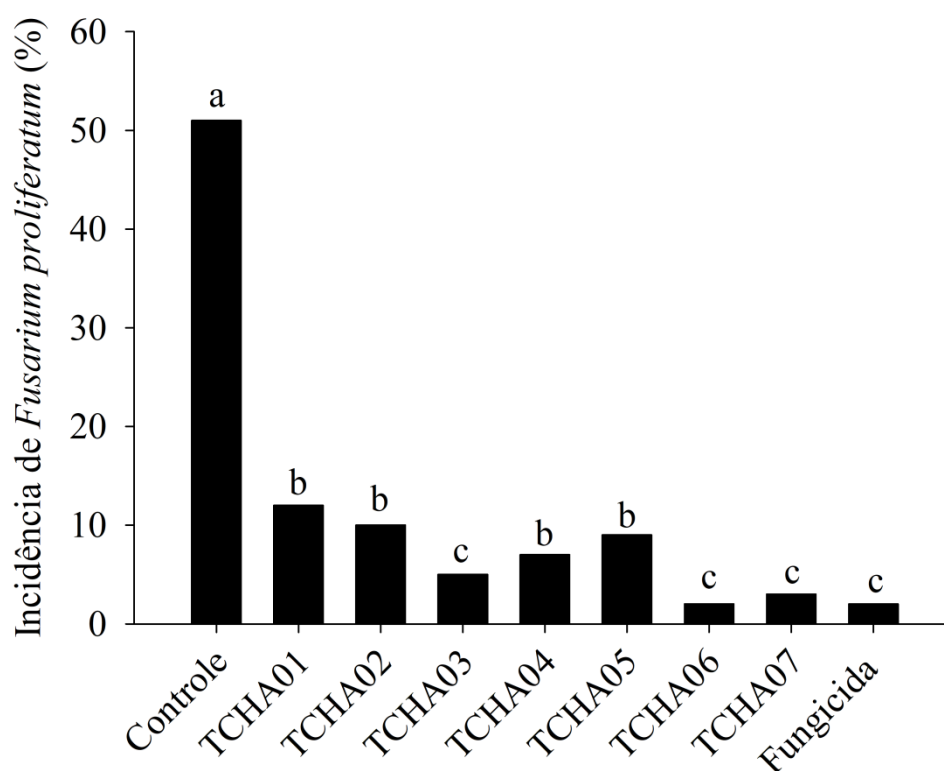


Figura 4. Incidência de *Fusarium proliferatum* em sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) microbiolizadas com *Trichoderma* sp.. Médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida: 240g/100 kg de sementes.

Pesquisas com controle biológico no tratamento de sementes têm sido realizadas e resultados promissores foram obtidos: Carvalho et al. (2011) constataram que *T. harzianum* foi capaz de reduzir de 35% a 51% na incidência de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* associados a sementes de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). Dubey et al. (2007) verificaram redução da incidência de *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* em sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum*) tratadas com *T. viride*, *T. harzianum* e *T. virens*. Farias et al. (2019) confirmaram o potencial de *Trichoderma* sp. na redução da incidência de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) de até 39% nas sementes tratadas. Silva et al. (2019) observaram redução da incidência de *F. subglutinans* por *Trichoderma* sp. em sementes de pinus (*Pinus* spp.).

3.3. Testes de germinação e emergência

Foram observadas diferenças para primeira contagem de germinação, germinação, índice de velocidade de germinação (IVG), emergência e índice de velocidade de emergência (IVE) para todos os tratamentos, com aumento significativo quando comparados com o tratamento controle e os mesmos não diferiram entre si (Tabela 7).

Para primeira contagem de emergência, com exceção do tratamento TCH04, os melhores resultados foram obtidos com TCH03 e TCH07, com valores de 80% e 74%, respectivamente, não diferindo do fungicida (74%) (Tabela 7).

Tabela 7. Primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), índice de velocidade de germinação (IVG), primeira contagem de emergência (PCE), emergência (E) e índice de velocidade de emergência (IVE) de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.), cultivar BRS 324, inoculadas com *Trichoderma* sp..

Tratamentos	PCG (%)	G (%)	IVG	PCE (%)	E (%)	IVE
Controle	48,00b	66b	14,17b	55c	67b	16,08b
TCH01	67,00a	82a	18,52a	67b	85a	20,50a
TCH02	81,00a	93a	21,99a	67b	83a	19,40a
TCH03	79,00a	87a	20,85a	80a	83a	20,38a
TCH04	72,00a	83a	19,91a	66b	81a	19,13a
TCH05	75,00a	83a	19,85a	60c	85a	19,08a
TCH06	81,00a	88a	21,17a	67b	84a	19,56a
TCH07	84,00a	87a	21,56a	74a	87a	20,81a
Captana	81,00a	88a	21,29a	74a	83a	20,20a
CV (%)	13,78	10,66	11,38	10,35	5,63	7,55

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida: 240g/100 kg de sementes.

Resultados semelhantes foram observados por Martini et al. (2014), ao verificarem que os metabólitos secundários liberados por *Trichoderma* sp., usados para inibir o desenvolvimento de *Fusarium* sp. veiculados por sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) não interferiram na germinação das mesmas. Xue et al. (2019) constataram um aumento na emergência e massa seca de plântulas de trigo (*Triticum* sp.) inoculadas com *Trichoderma* sp.. Carvalho et al., 2014, também verificaram um aumento da taxa de germinação em sementes de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas com *T. harzianum*.

Além de contribuir para um controle mais estável das doenças, podendo ao longo dos anos alterar o equilíbrio dos agroecossistemas, tornando inóspito ao desenvolvimento dos patógenos e sem causar impactos negativos (MACHADO et al., 2012), o uso de *Trichoderma* sp. no tratamento de sementes pode resultar em uniformidade de germinação e emergência.

O isolado TCH05 foi o que proporcionou melhor desempenho do crescimento da parte aérea no teste de germinação, com valor médio de 7,4 cm, diferindo do tratamento controle (2,1 cm) e não diferindo do fungicida (7,5 cm). No teste de emergência, os melhores resultados para comprimento de parte aérea foram nos tratamentos com TCH05 (18,6 cm), TCH06 (18,1 cm) e TCH07 (18,3) (Tabela 8).

Os isolados de *Trichoderma* que proporcionaram as maiores médias de massa seca de parte aérea foram TCH03, TCH05, TCH06 e TCH07 no teste de germinação e TCH05 e TCH07 no teste de emergência (Tabela 8).

Tabela 8. Comprimento da parte aérea nos testes de germinação (CPG) e emergência (CPE) e massa seca da parte aérea nos testes de germinação (MSPG) e emergência (MSPE) de plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), cultivar BRS 324, inoculadas com *Trichoderma* sp..

Tratamentos	CPG (cm)	CPE (cm)	MSPG (g)	MSPE (g)
Controle	2,1d	11,5d	0,020b	0,081d
TCH01	2,7c	17,1b	0,024b	0,160b
TCH02	3,3c	16,8b	0,023b	0,140c
TCH03	3,6c	17,0b	0,029a	0,132c
TCH04	3,4c	17,4b	0,023b	0,170b
TCH05	7,4a	18,6a	0,027a	0,200a
TCH06	6,3b	18,1a	0,028a	0,170b
TCH07	5,9b	18,3a	0,026a	0,190a
Captana	7,5a	13,6c	0,025a	0,140c
CV (%)	12,13	3,66	14,74	9,64

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida: 240g/100 kg de sementes.

Verificou-se que para o comprimento de raízes no teste de germinação, todos os tratamentos diferiram do tratamento controle, sendo TCH05 (10,8 cm) o que proporcionou os maiores valores diferindo dos demais. No teste de emergência foram TCH03 (19,6 cm), TCH04 (21,2 cm), TCH05 (21,1 cm) e TCH06 (20,7 cm) que apresentaram maiores médias de comprimento de raízes (Tabela 9).

Em relação aos resultados da massa seca de raízes no teste de germinação, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos com *Trichoderma* spp.. Para massa seca de raízes no teste de emergência, TCH01 e TCH02 não diferiram do tratamento controle e nem do fungicida. TCH04 e TCH06 foram os que proporcionaram maior massa seca de raízes no teste de emergência, sendo significativamente superior, com valores médios de 0,210 g (Tabela 9).

Tabela 9. Comprimento de raízes nos testes de germinação (CRG) e emergência (CRE) e massa seca de raízes nos testes de germinação (MSRG) e emergência (MSRE), de plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), cultivar BRS 324, inoculadas com *Trichoderma* sp..

Tratamentos	CRG (cm)	CRE (cm)	MSRG (g)	MSRE (g)
Controle	2,3e	14,2c	0,002a	0,114c
TCH01	2,7d	18,1b	0,006a	0,160b
TCH02	3,9d	18,9b	0,016a	0,114c
TCH03	3,3d	19,6a	0,002a	0,130c
TCH04	3,5d	21,2a	0,021a	0,172b
TCH05	10,8a	21,1a	0,022a	0,210a
TCH06	9,3b	20,7a	0,005a	0,170b
TCH07	8,1c	20,4a	0,005a	0,210a
Captana	9,0b	17,9b	0,004a	0,131c
CV (%)	10,43	7,60	2,73	16,93

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida: 240g/100 kg de sementes.

Observou-se que *Trichoderma* sp. colonizou de forma eficiente o sistema radicular das plântulas tratadas, sendo este um fator de fundamental importância, pois *Fusarium* spp. infecta a planta hospedeira através das raízes ou caules. De forma semelhante, a colonização de *T. harzianum* também foi observada por Ferrigo et al. (2014), em raízes de milho (*Zea mays* L.) em condições axênicas, resultando em aumento significativo das mesmas.

De acordo com Saravanakumar et al. (2016) a sobrevivência e colonização bem-sucedidas do antagonista na planta hospedeira é essencial para o biocontrole da doença ocasionada por *Fusarium* spp.. Ainda segundo Ferrigo et al. (2014), *Trichoderma* sp. é eficaz

e caracterizado por possuir boa competência na rizosfera e capacidade de colonizar raízes das plantas.

Na Figura 5, observa-se plântulas de girassol provenientes de sementes *tratadas* com *Trichoderma* sp., no teste de germinação (Figura 5A) e emergência (Figura 5B), respectivamente.



Figura 5. Crescimento inicial de plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), cv BRS 324, oriundas dos testes de germinação em substrato de papel (A) e emergência em substrato xxxxxx (B), inoculadas com *Trichoderma* sp.. T1 – Controle (composta pelas sementes imersas em ADE); T2 – Inoculação com TCH01 (sementes inoculadas com *Trichoderma asperellum* isolado de Trichodel[®]); T3 - Inoculação com TCH02; T4 - Inoculação com TCH03; T5 – Inoculação com TCH04; T6 – Inoculação com TCH05; T7 – Inoculação com TCH06; T8 – Inoculação com TCH07; T9 - Tratamento com fungicida Captana. Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida: 240g/100 kg de sementes.

3.4. Teste de colonização endofítica

Observou-se que *Trichoderma* spp. colonizou de forma eficiente o sistema radicular das plantas de girassol, conforme observado pelo plaqueamento das porções das raízes em meio BDA. Com exceção de TCH01, TCH02 e TCH03, os demais isolados também foram detectados no caule das plântulas tratadas. Nenhum isolado foi encontrado colonizando as folhas das plântulas de girassol (Tabela 10).

Tabela 10. Presença (+) e ausência (-) de *Trichoderma* spp. em diferentes partes de plântulas de girassol (*Helianthus annuus* L.), detectadas pelo teste de colonização endofítica.

Tratamentos	Raízes	Caule	Folhas
Controle	-	-	-
TCH01	+	-	-
TCH02	+	-	-
TCH03	+	-	-
TCH04	+	+	-
TCH05	+	+	-
TCH06	+	+	-
TCH07	+	+	-

Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹.

Trichoderma spp. têm sido detectado colonizando, endoliticamente, plantas de diversas famílias botânicas, sem causar doenças, ou proporcionando o controle de patógenos, ou promoção do crescimento. A capacidade desse antagonista de crescer ao longo das raízes representa uma característica importante para um potencial agente de biocontrole.

De forma semelhante, a colonização de *T. harzianum* (FERRIGO et al., 2014) e *T. gamsii*, *T. afroharzianum* (GALLETTI et al., 2020) e *T. atroviride* (CONINCK et al., 2020) também foram observadas em raízes de milho (*Zea mays* L.) em condições axênicas.

Os efeitos benéficos de *Trichoderma* spp. pode diferir em relação ao genótipo da planta, isolado fúngico e concentrações aplicadas (ISLAM et al., 2014). Ferrigo et al. (2020) observaram uma maior colonização de *T. harzianum* em raízes do híbrido 1 em comparação ao híbrido 2 de milho, independentemente das condições do solo, podendo estar relacionadas a uma diferença na taxa ou composição dos exsudatos radiculares.

A colonização por *Trichoderma* sp. é modulada por interações específicas reguladas pelo hospedeiro (MORÁN-DIEZ et al., 2015). A liberação de exsudatos radiculares da planta

hospedeira favorece a germinação de conídios de *Trichoderma* spp., indicando que o fungo e as plantas obtêm benefícios mútuos (RAMÍREZ-VALDESPINO et al., 2019).

3.5. *Trichoderma* sp. no manejo da murcha causada por *Fusarium proliferatum* através do tratamento de sementes

O tratamento das sementes com *Trichoderma* sp., resultou em uma diminuição geral da colonização do patógeno em plantas de girassol. Isso pode ser observado na Tabela 12, onde as plantas inoculadas com *F. proliferatum* e que não foram tratadas com *Trichoderma* sp. apresentaram incidência de doença significativamente superior as que receberam o antagonista. Ressalta-se que TCH06 foi o mais eficiente no controle da murcha de fusário, constituindo um isolado promissor quanto ao uso no manejo integrado.

Com relação à severidade, observou-se amplitude de variação entre 2,75 e 0,0 (escala de 0-3), onde todos os tratamentos com *Trichoderma* sp. diferiram do tratamento controle (2,75) e não diferiram entre si. O menor índice de severidade de doença (ISD) foi verificado por TCH06, que diferiu dos demais (Tabela 11).

Tabela 11. Incidência (%), severidade e índice de severidade de doença (ISD - %) da murcha de fusário em plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.), cultivar BRS 324, aos 57 DAS, inoculadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp..

Tratamentos	Incidência (%)	Severidade* (nota)	ISD (%)
Controle Positivo	0,0c	0b	0c
Controle Negativo	81,25a	2,75a	55a
TCH01	31,25b	0,5b	10b
TCH02	12,50b	0,5b	10b
TCH03	25,0b	0,5b	10b
TCH04	12,5b	0,25b	5b
TCH05	25,0b	0,25b	5b
TCH06	0,0c	0,b	0c
TCH07	18,75b	0,25b	5b
Captana	31,25b	1,0b	20b
CV (%)	20,02	16,49	16,07

*Valores calculados com base numa amostra de 12 plantas para as quais atribuíram-se notas de 0 a 5 em que: 0= ausência de sintoma; 1= sintomas iniciais de murcha (amarelecimento) e descoloração vascular; 2= até 25% das folhas com murcha e descoloração vascular extensa até o primeiro par de folhas; 3= até 50% das folhas com murcha e descoloração vascular até metade da haste; 4 = até 75% das folhas com murcha e descoloração vascular por toda haste; 5= plantas mortas. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle Positivo - Ausência do antagonista e ausência do patógeno; Controle Negativo – Ausência do antagonista e presença do patógeno. Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida: 240g/100 kg de sementes.

Gava; Menezes (2012) também constataram potencial antagônico de *T. koningii* e *T. polysporum* no controle de patógenos de solo na cultura do meloeiro (*Cucumis melo* L.), aplicados antes do plantio, onde verificaram maior número de plantas e, consequentemente, uma maior produtividade de frutos. Esses mesmos autores também observaram que esses isolados colonizaram ativamente a rizosfera tornando esse ambiente inóspito para o crescimento de patógenos. Xue et al. (2019) também verificaram que *Trichoderma* sp., inoculado em sementes de trigo (*Triticum* sp.), reduziu eficientemente a severidade da murcha ocasionada por *F. graminearum*. Esses autores ainda constataram que, além de reduzir a severidade do patógeno, *Trichoderma* sp. também inibiu os efeitos negativos causado por outros patógenos transmitidos por sementes e solo, e que causaram doenças pré e pós-emergência no campo.

Galletti et al. (2020) observaram que a frequência de distribuição das áreas necróticas e crescimento endofítico do patógeno no caule, onde o fungo cresce ativamente, foi significativamente menor nas plantas cultivadas a partir de sementes tratadas com *Trichoderma* spp., semelhante aos resultados encontrados nessa pesquisa.

Entre os tratamentos com *Trichoderma* sp. houve diferença estatística quando comparados ao tratamento controle e ao fungicida para número de folhas de plantas e os tratamentos com os antagonistas não diferiram entre si. Constatou-se que todos os tratamentos com *Trichoderma* sp. foram os que produziram melhor desempenho do crescimento da parte aérea e massa fresca e seca de parte aérea das plantas tratadas e não diferiram entre si (Tabela 12).

Os tratamentos com TCH04 e TCH05 foram os que proporcionaram valores de massa fresca de raízes (MFRA) e massa seca de raízes (MSRA) significativamente superior, sendo 166,3 g e 156,0 g para MFRA e 29,0 g e 27,8 g para MSRA, respectivamente, diferindo dos demais (Tabela 12).

Tabela 12. Número de folhas (NF), comprimento de parte aérea (CPA), massa fresca de parte aérea (MFPA), massa fresca de raízes (MFRA), massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca de raízes (MSRA) de plantas de girassol (*Helianthus annuus* L.), cultivar BRS 324, aos 57 DAS, inoculadas com *Trichoderma* sp..

Tratamentos	NF -	CPA (cm)	MFPA (g)	MFRA (g)	MSPA (g)	MSRA (g)
Controle Positivo	20,75a	96,6b	173,8b	105,6b	19,1b	16,7c
Controle Negativo	19,00b	93,9b	147,3c	60,25c	16,2c	9,3d
TCH01	21,25a	116,6a	208,9a	103,3b	22,8a	13,2c
TCH02	21,50a	110,0a	201,4a	117,8b	22,2a	16,7c
TCH03	20,75a	113,0a	190,2a	125,3b	21,2a	22,2b
TCH04	21,50a	110,0a	192,3a	166,3a	21,3a	29,0a
TCH05	21,75a	109,7a	208,9a	156,0a	23,1a	27,8a
TCH06	21,50a	113,9a	207,2a	122,0b	22,9a	23,9b
TCH07	22,00a	115,6a	205,7a	127,6b	22,3a	25,1b
Captana	19,50b	94,9b	168,1b	85,6c	18,4b	20,1b
CV (%)	6,98	6,79	6,25	14,95	5,77	17,48

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Scott Knott a 5% de probabilidade. Controle Positivo - Ausência do antagonista e ausência do patógeno; Controle Negativo - Ausência do antagonista e presença do patógeno. Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes).

A redução do crescimento da planta e biomassa pode ser causada pelo bloqueio dos feixes vasculares devido à proliferação do patógeno, produção de toxinas e restrição no transporte de água e nutrientes (SINGH et al., 2020). Os resultados da presente pesquisa corroboram com Xue et al., (2017); SILVA et al., (2019) , onde o tratamento de sementes ou a adição cepas específicas de *Trichoderma* sp. na rizosfera podem resultar em promoção do crescimento de plantas e aumento de produtividade, possuindo características com potencial comercial, sendo uma alternativa ao uso de fungicidas.

3.6. Atividade enzimática induzida por *Trichoderma* sp. em plantas de girassol

A atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) em plantas de girassol elevou-se significativamente com a inoculação dos isolados TCHA03, TCHA04 e TCHA06, atingindo de 0,36; 0,37 e 0,32 U.A min⁻¹ mg⁻¹ proteína, e aumentos de 36; 37,8 e 28%, respectivamente, em comparação ao tratamento controle (0,23 U.A min⁻¹ mg⁻¹ proteína) (Figura 6).

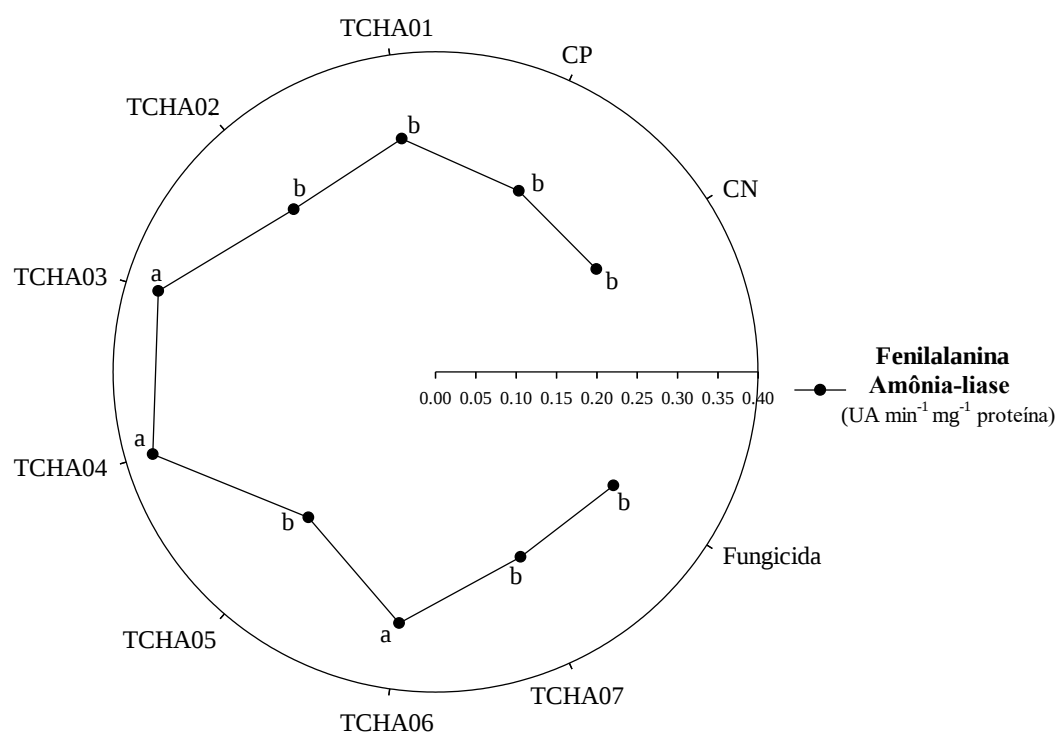


Figura 6. Atividade da Fenilalanina amônia-liase em girassol (*Helianthus annuus* L.), cv. BRS 324, inoculadas com *F. proliferatum* e tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. via sementes. Diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes).

A atividade da peroxidase (POD) elevou-se em plantas de girassol, onde as sementes foram microbiolizadas com todos os isolados de *Trichoderma* sp., sendo os melhores resultados observados para TCHA02, TCHA03, TCHA06 e TCHA07, onde observou-se atividade da enzima de 1,34; 1,41; 1,41 e 1,24 U.A min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Figura 7).

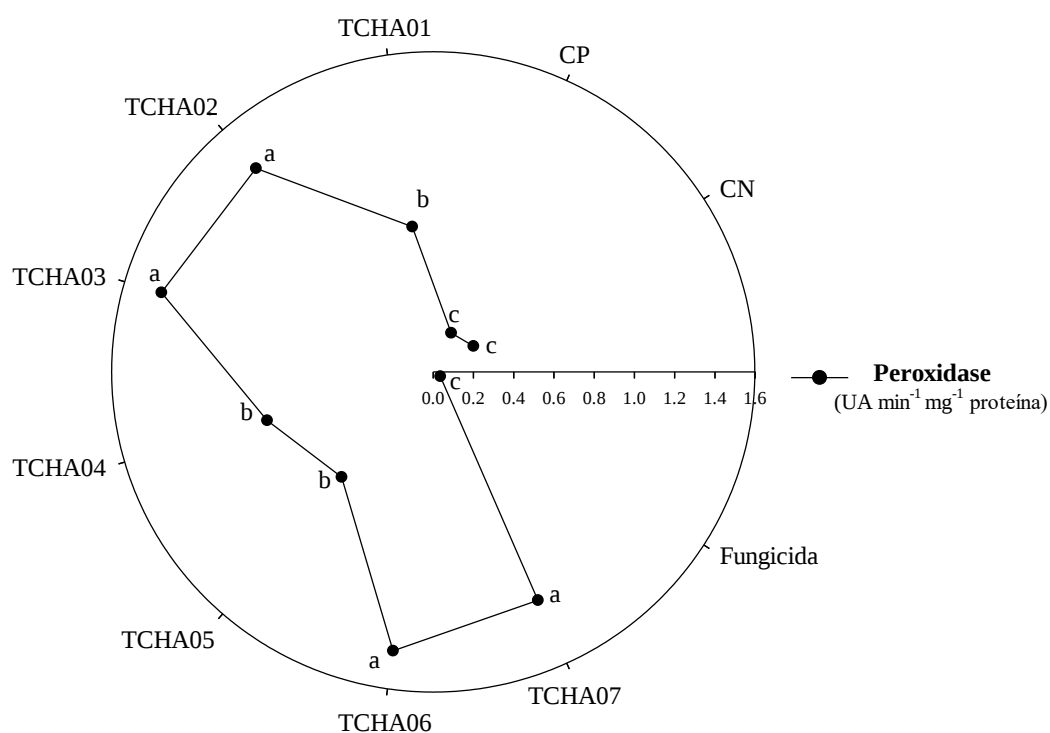


Figura 7. Atividade da Peroxidase em girassol (*Helianthus annuus* L.), cv. BRS 324, inoculadas com *F. proliferatum* e tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. via sementes. Diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes).

Observou-se diferença significativa para atividade da polifenoloxidase nas plantas de girassol que teve as sementes tratadas com todos os isolados de *Trichoderma* sp., com valores que variaram de 0,51 a 0,57 U.A min⁻¹ mg⁻¹ proteína, não diferindo entre si (Figura 8).

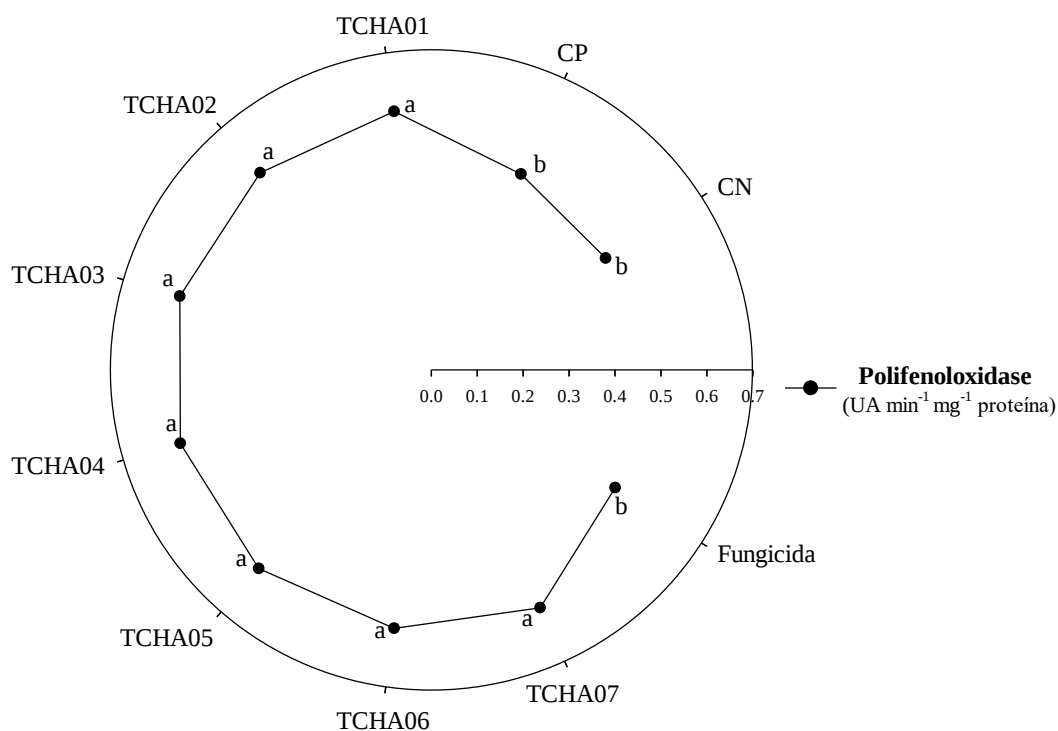


Figura 8. Atividade da Polifenoloxidase em girassol (*Helianthus annuus* L.), cv. BRS 324, inoculadas com *F. proliferatum* e tratadas com diferentes isolados de *Trichoderma* sp. via sementes. Diferença significativa em relação ao tratamento controle pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$). Controle: sementes desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1% por 3 min; Concentração da suspensão dos isolados de *Trichoderma* sp.: $1,0 \times 10^7$ conídios/mL⁻¹; Fungicida Captana (240g/100 kg de sementes).

O aumento da atividade dessas enzimas é geralmente observado no contato da planta com o patógeno, no entanto, elas também são frequentemente estimuladas por microrganismos benéficos durante o mecanismo de resistência induzida (CHOUDHARY et al., 2016). O aumento da atividade de fenilalanina amônia-liase (PAL), peroxidase (PO) e polifenoloxidase (PPO) em plantas tratadas com microrganismos via sementes já foi relatado, na redução da infecção de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (SINGH et al., 2020) e *F. verticillioides* (GALLETTI et al., 2020). Esses estudos fornecem evidências que a aplicação de *Trichoderma* spp. via tratamento de sementes, é uma ferramenta promissora e corroboram com os resultados da presente pesquisa no controle de *F. proliferatum* em girassol.

4. CONCLUSÃO

Os isolados de *Trichoderma* sp. testados possuem potencial para controle de *F. proliferatum* via microbiolização de sementes;

A microbiolização de sementes de girassol com *Trichoderma* sp. proporciona um aumento na germinação, emergência e crescimento inicial de plântulas;

Trichoderma sp. reduz a incidência e severidade da murcha ocasionada por *F. proliferatum* em plantas de girassol.

Os isolados induzem a produção de enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia liase em plantas que receberam o tratamento com *Trichoderma* sp. via sementes.

REFERÊNCIAS

- BABYCHAN, M.; SIMON, S. Efficacy of *Trichoderma* sp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) infecting pre-and post-seedling of tomato. **Journal of pharmacognosy and phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 616-619, 2017.
- BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipellis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 441-443, 1997.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHABELL, D. K.; WELLS, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, 72, 379-382, 1982.
- BOMFIM, M. P.; SÃO JOSÉ, A. R.; REBOUÇAS, T. N. H.; ALMEIDA, S. S.; SOUZA, I. V. B.; DIAS, N. O. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* sp. a *Rhizopus stolonifer* no maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 61-67, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL (2009). Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 395p.
- CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 384-391, 2014.
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; GERALDINE, A. M. Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common bean seedlings by *Trichoderma harzianum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 8, p. 822-828, 2011.
- Choudhary, D. K.; Varma, A.; Tuteja, N. (Eds.). **Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture**. Springer Singapore. 2016.
- CONINCK, E.; SCAUFLAIRE, J.; GOLLIER, M.; LIÉNARD, C.; FOUCART, G.; MANSSENS, G.; MUNAUT, F.; LEGRÈVE, A. *Trichoderma atroviride* como um promissor agente de biocontrole em recobrimento de sementes para redução do amortecimento de *Fusarium* em milho. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-15, 2020.
- DARYAEI, A.; JONES, E. E.; GHAZALIBIGLAR, H.; GLARE, T. R.; FALLOON, R. E. Effects of temperature, light and incubation period on production, germination and bioactivity of *Trichoderma atroviride*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 999-1009, 2016.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. III - Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, p. 368-369, 1971.

DINESH, K.; SINH, B.; BAI, A. T. In vitro studies on efficacy of various *Trichoderma* spp. Against collar rot of tomato caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc. in Manipur. **International Journal of Chemical Studies**, v. 6, n. 6, p. 1654-1656, 2018.

DUBEY, S. C.; SURESH, M.; SINGH, B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. **Biological Control**, v. 40, p. 118-127, 2007.

EL_KOMY, M. H. E.; SALEH, A. A.; ERANTHODI, A.; MOLAN, Y. Y. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt. **The Plant Pathology Journal**, v. 31, n. 1, p. 50-60, 2015.

FARIAS, O. R.; NASCIMENTO, L. C.; CRUZ, J. M. F. L.; SILVA, H. A. O.; OLIVEIRA, M. D. M.; BRUNO, R. L. A.; ARRIEL, N. H. C. Biocontrol Potential of *Trichoderma* and *Bacillus* Species on *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 34, n. 2, p. 1-11, 2019.

FERRIGO, D.; MONDIN, M.; EDITH, L.; FABIO, F.; CAUSIN, R.; RAIOLA, A. Effect of seed biopriming with *Trichoderma harzianum* strain INAT11 on *Fusarium* ear rot and Gibberella ear rot diseases. **Biological Control**, v. 147, 104286, 2020.

FERRIGO, D.; RAIOLA, A.; RASERA, R.; CAUSIN, R. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. **Crop Protection**, v. 65, n. 1, p. 51-56, 2014.

GALLETTI, S.; PARIS, R.; CIANCHETTA, S. Selected isolates of *Trichoderma gamsii* induce different pathways of systemic resistance in maize upon *Fusarium verticillioides* challenge. **Microbiological Research**, v. 233, 126406, 2020.

GAVA, C. A. T.; MENEZES, M. E. L. Eficiência de isolados de *Trichoderma* spp. no controle de patógenos de solo em meloeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 4, p. 633-640, 2012.

HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 439-445, 2012.

KARLSSON, I.; EDEL-HERMANN, V.; GAUTHERON, N.; DURLING, M. B.; KOLSETH, A. K.; STEINBERG, C.; PERSSON, P.; FRIBERG, H. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, 491-501, 2016.

KAWUBE, G.; KANOBE, C.; EDEMA, R.; TUSIIME, G.; MUDINGOTTO, P. J.; ADIPALA, E. Efficacy of manual seed sorting methods in reduction of transmission of rice and cowpea seed-borne diseases. **African Crop Science Conference Proceeding**, v. 7, p. 1363- 1367, 2005.

KEERIO, A.; NIZAMANI, Z. A.; HUSSAIN, S.; RAFIQ, M.; IQBAL, S.; KEERIO, A. Efficacy of some chemical fungicides against fusarium wilt of sunflower *in-vtro* condition

couse by *Fusarium oxysporum*. **International Journal of Botany Studies**, v. 2, n. 5, p. 80-85, 2017.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; BELTRAME, R.; SANTOS, Á. F.; MÜLLER, J.; ARAÚJO, M. M. Tratamento biológico e químico em sementes de *Cedrela fissilis* para controle de *Rhizoctonia* sp. **Cerne**, v. 19, n. 1, p. 169-175, 2013.

LORITO, M.; WOO, S. L.; HARMAN, G. E.; MONTE, E. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. **Annual Review of Phytopathology**, v. 48, p. 395-417, 2010.

LUSTRI, E. A.; SILVA, B. T.; PERUCHI, D. R. E.; MOURA, I. A.; FLUMINHAN, A. Avaliação do desempenho agrônômico de cultivares de girassol (*Helianthus annuus* L.) no cultivo em safrinha na região Oeste Paulista. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 13, n. 1, p. 37-51, 2017.

MACHADO, D. F. M.; PARZIANELLO, F. R.; SILVA, A. C. F.; ANTONIOLLI, Z. I. *Trichoderma* no Brasil: o fungo e o bioagente. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 274-288, 2012.

MACHELEIDT, J.; MATTERN, D. J.; FISCHER, J.; NETZKER, T.; WEBER, J.; SCHROECKH, V.; BRAKHAGE, A. A. Regulation and role of fungal secondary metabolites. **Annual review of genetics**, v. 50, p. 371-392, 2016.

MACIEL, C. G.; WALKER, C.; MUNIZ, M. F. B.; ARAUJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* sp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii* Engelm. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 505-512, 2014.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination aid in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MARTINI, L. B.; ETHUR, L. Z.; DORNELES, K. R. Influência de metabólitos secundários de *Trichoderma* sp. no desenvolvimento de fungos veiculados pelas sementes e na germinação de sementes de arroz. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 2, p. 86-91, 2014.

MASTOURI, F.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G. E. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology**, v. 100, n. 11, p. 1213-1221, 2010.

MBARGA, J. B.; TEN HOOPEN, G. M.; KUATÉ, J.; ADIOBO, A.; NGONKEU, M. E. L.; AMBANG, Z.; AKOA, A.; TONDJE, P. R.; BEGOUDE, B. A. D. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum*, causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. **Crop Protection**, v. 36, p. 18-22, 2012.

MILANESI, P. M.; BLUME, E.; ANTONIOLI, Z. I.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, R. F.; FINGER, G. D.; URIGON, M. R. Biocontrole de *Fusarium* sp. com *Trichoderma* sp. e promoção de crescimento em plântulas de soja. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n.3, p. 347-356, 2013.

MORÁN-DIEZ, M. E.; TRUSHINA, N.; LAMDAN, N. L.; ROSENFELDER, L.; MUKHERJEE, P. K.; KENERLEY, C. M.; HORWITZ, B. A. Host-specific transcriptomic pattern of *Trichoderma virens* during interaction with maize or tomato roots. **BMC Genomics**, v. 16, n. 8, p. 1-15, 2015.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two Divergent Intragenomic rDNA ITS2 Types within a Monophyletic Lineage of the Fungus *Fusarium* Are Nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 7, n. 1, p. 103-116, 1997.

OLIVEIRA, J. A. (1991). **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativas* L.) e pimentão (*Capsicum annuum* L.)**. 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras/MG.

OOI, K. H. (2002). **Pencirian dan pengawalan kimia *Fusarium oxysporum*, penyebab penyakit layu vascular pada rosel** (Doctoral dissertation, Ph. D. thesis. University Sains Malaysia, Malaysia).

PEREIRA, J. L.; QUEIROZ, R. M. L.; CHARNEAU, S. O.; FELIX, C. R.; RICART, C. A. O.; SILVA, F. L.; STEINDORFF, A. S.; ULHOA, C. J.; NORONHA, E. F. Analysis of *Phaseolus vulgaris* Response to Its Association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the Presence or Absence of the Phytopathogenic Fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. **Plos One**, v. 9, n. 5, e98234, 2014.

PIMENTEL, I. C.; KUCZKOWSKI, F. R.; CHIME, M. A.; AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A. Fungos endofíticos em folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.). **Floresta**, v. 36, p. 123-128, 2006.

RAMÍREZ-VALDESPINO, C. A.; CASAS-FLORES, S.; OLMEDO-MONFIL, V. *Trichoderma* as a model to study effector-like molecules. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 1030, 2019.

REN, J.; ZHANG, G.; ZHANG, Y. Y.; ZHANG, J.; ZHENG, H. L.; JING, L.; ZHOU, H. Y.; ZHAO, J. First report of sunflower wilt caused by *Fusarium proliferatum* in Inner Mongolia, China. **Plant Disease**, v. 99, n. 9, p. 1275-1275, 2015.

SÁ, M. N. F.; LIMA, J. S.; JESUS, F. N.; PEREZ, J. O.; GAVA, C. A. T. Seleção *in vitro* de agentes de biocontrole visando o controle de *Fusarium* sp. **Acta Brasiliensis**, v. 3, n. 1, p. 14-16, 2019.

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

SEIFERT, K.; MORGAN-JONES, G.; GAMS, W.; KENDRICK, B. **The genera of Hyphomycetes**. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. 2011.866p.

SHARFUN-NAHAR.; MUHAMMAD, M. Pathogenecity and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species (sec. Liseola and Sporotrichiella) in sunflower. **Pakistan Journal of Botany**, v. 38, n. 2, p. 487-492, 2006.

SILVA FLÁVIO, N. S. D.; SALES, N. D. L. P.; AQUINO, C. F.; SOARES, E. P. S.; AQUINO, L. F. S.; CATÃO, H. C. R. M. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de sorgo tratadas com extratos aquosos e óleos essenciais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 7-20, 2014.

SILVA, T. W. R.; SANTOS, A. F.; AUER, C. G.; TESSMANN, D. J. Pine seeds treatment with *Trichoderma* for *Fusarium* control. **Floresta e Ambiente**, v. 26, n. 2, e20170875, 2019.

SINGH, N.; MUKHERJEE, S. K.; RAJAM, M. V. Silencing of the Ornithine Decarboxylase Gene of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by Host-Induced RNAi Confers Resistance to *Fusarium* Wilt in Tomato. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-11, 2020.

SOUSA, M. V.; MACHADO, J. C.; PFENNING, L. H.; KAWASAKI, V. H.; ARAÚJO, D. V.; SILVA, A. A.; MARTINI NETO, A. Métodos de inoculação e efeito de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* em sementes de algodoeiro. **Tropical plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 041-049, 2008.

VINALE, F.; SIVASITHAMPARAM, K.; GHISALBERTI, E. L.; MARRA, R.; WOO, S. L.; LORITO, M. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, n.1, p. 1-10, 2008.

XUE, A. G.; GUO, W.; CHEN, Y.; SIDDIQUI, I.; MARCHAND, G.; LIU, J.; REN, C. Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* sp. on establishment and yield of spring wheat. **Crop Protection**, v. 96, p. 97-102, 2017.

ZEILINGER, S.; GRUBERA, S.; BANSALB, R.; MUKHERJEE, P. K. Secondary metabolism in *Trichoderma* e Chemistry meets genomics. **Fungal Biology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 74-90, 2016.