

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

TESE

**Murcha-de-Fusário do Tomateiro, Causada por
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*, em Nova
Friburgo, RJ: Raças, Resistência Genética e Manejo**

Cristiana Maia de Oliveira

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

**Murcha-de-Fusário do Tomateiro, Causada por
Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici*, em Nova
Friburgo, RJ: Raças, Resistência Genética e Manejo**

CRISTIANA MAIA DE OLIVEIRA

Sob a Orientação da professora
Dr^a Margarida Goréte Ferreira do Carmo

e Co-orientação do professor
Dr Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, Área de Concentração Produção Vegetal.

Seropédica, RJ
Agosto de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48m	<p>Oliveira, Cristiana Maia de, 85- Murcha-de-fusário do tomateiro, causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>, em Nova Friburgo, RJ: raças, resistência genética e manejo / Cristiana Maia de Oliveira. - 2017. 142 f.: il. Orientadora: Margarida Goréte Ferreira do Carmo. Coorientador: Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho. Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós Graduação em Fitotecnia, 2017. 1. Murcha-de-fusário. 2. <i>Solanum lycopersicum</i>. 3. Agricultura familiar. 4. Variedades diferenciadoras. 5. Manejo. I. Carmo, Margarida Goréte Ferreira do, 63 , orient. II. Sobrinho, Nelson Moura Brasil do Amaral, 56-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós Graduação em Fitotecnia. IV. Título.</p>
------	---

É permitida a cópia parcial ou total desta tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA**

CRISTIANA MAIA DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ, área de Concentração em Produção Vegetal.

TESE APROVADA EM 25/08/2017.

Margarida Goréte Ferreira do Carmo. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Rosana Rodrigues. Dra. UENF

Leonardo Silva Boiteux. Dr. EMBRAPA/CNPH

Carlos Antonio Inácio. Dr. UFRRJ

José Ivo Baldani. Dr. EMBRAPA/Agrobiologia

DEDICATÓRIA

*À Deus,
aos meus pais, Anilso Sampaio de Oliveira e Ana Cristina Maia de Oliveira e
ao meu noivo Leandro Martins Ferreira
por todo amor, carinho e incentivo*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por iluminar meus caminhos durante esta jornada.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Ao curso de Pós-Graduação em Fitotecnia da UFRRJ pela oportunidade de cursar o mestrado e o doutorado.

À CAPES pelo fomento no Brasil e pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche no exterior.

À professora Margarida Goréte Ferreira do Carmo pela oportunidade, orientação, ensinamentos e confiança durante esse período.

Ao professor Nelson M. B. A. Sobrinho pela contribuição e apoio para a realização deste trabalho.

Aos professores Rosana Rodrigues, Leonardo Silva Boiteux, Carlos Antonio Inácio e José Ivo Baldani por colaborarem na melhoria deste trabalho.

À Doutora Monica Höfte e ao *Laboratory of Phytopathology* pela oportunidade e aprendizado na *Universiteit Gent*.

À minha família em especial aos meus pais Anilso Sampaio de Oliveira e Ana Cristina Maia de Oliveira pelo apoio e incentivo para que eu seguisse essa carreira profissional.

Ao meu noivo Leandro Martins Ferreira pela ajuda, paciência e por estar sempre ao meu lado me incentivando.

Aos Doutores Érica Abreu, Evandro Silva e Orlando Tavares pelo auxílio prestado.

Aos amigos do Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes Débora, Lígia, Kaoany, Carlos, Paula, Louise, Caio, Maurílio, Lucas, Danielle, Fernanda, Aline, Jéssica, a amiga Francine da Embrapa Agrobiologia ao Fábio e estagiários do Laboratório de Química e Poluição do Solo pelo apoio na condução dos trabalhos de campo e de laboratórios e pelos momentos de descontração.

Aos funcionários do Departamento de Fitotecnia, em especial a Liliane e a Tatiane pela presteza e amizade.

Aos funcionários do Setor de Horticultura e Fitotecnia pelo auxílio na implantação dos experimentos.

Aos produtores de Nova Friburgo pela oportunidade da realização desse trabalho na região.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Obrigada!

BIOGRAFIA

Cristiana Maia de Oliveira, nascida no Rio de Janeiro em 04 de fevereiro de 1985. Concluiu o ensino fundamental no colégio Estadual João Paulo II e o ensino médio na UESF (União Educacional Sul Fluminense).

Em junho de 2006 iniciou o curso de Engenharia Agrônoma na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), diplomando-se em 2011. Durante a graduação estagiou no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ.

Em 2011 iniciou o curso de Pós-graduação em Fitotecnia (UFRRJ) e desenvolveu sua dissertação de mestrado intitulada “Utilização de Película de Fécula de Mandioca e Extrato de Canela na Conservação Pós-Colheita de Tomate Cereja” sob a orientação da professora Doutora Regina Celi Cavestré Coneglian e co-orientação da professora Doutora Margarida Goréte Ferreira do Carmo.

Em 2013, foi aprovada para o doutorado no mesmo curso de Pós-Graduação e iniciou o desenvolvimento da tese “Murcho-de-fusário do Tomateiro, Causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em Nova Friburgo, RJ: Raças, Resistência Genética e Manejo”. orientada pela professora Doutora Margarida Goréte Ferreira do Carmo e co-orientada pelo professor Doutor Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho. Em 2015 foi selecionada para participar do programa de doutorado sanduíche no exterior (CAPES – PDSE), no qual, desenvolveu durante um ano, atividades relacionadas à sua linha de pesquisa no *Laboratory of Phytopathology* orientada pela Doutora Monica Höfte, da *Universiteit Gent*– Bélgica.

RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Cristiana Maia de. **Murcha-de-fusário do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em Nova Friburgo, RJ: raças, resistência genética e manejo.** 2017. 142p. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Dentre as principais doenças do tomateiro está a murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). O seu controle é dificultado pelo cultivo sucessivo do tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) por produtores especializados na cultura, pela capacidade de sobrevivência do patógeno no solo por longos períodos e pela presença de raças do patógeno. Até então já foram descritas três raças do patógeno no Brasil (1, 2 e 3) sendo a raça 3 de ocorrência mais restrita. A principal estratégia para controle da doença é o uso de cultivares resistentes à(s) raça(s) presentes na região. O município de Nova Friburgo, RJ, importante região produtora de tomate no verão, apresenta sérios problemas com doenças causadas por patógenos habitantes do solo, que se intensificam devido a práticas inadequadas de manejo de solo. Diante disto, desenvolveu-se o presente trabalho tendo como base a coleta de amostras de solo e de plantas em 41 unidades familiares visando estudar diferentes aspectos relacionados à murcha-de-fusário na região. A apresentação do trabalho e dos resultados obtidos foi dividida em quatro capítulos. No Capítulo 1, são apresentados estudos com o levantamento sobre a ocorrência da doença nas propriedades e de identificação das raças predominantes. No Capítulo 2, são apresentados estudos sobre a incidência e distribuição da doença e avaliação das cultivares mais plantadas quanto a resistência às três raças de FOL. No Capítulo 3, são apresentados os estudos sobre as práticas de manejo adotadas pelos produtores e as suas relações com a fertilidade do solo, nutrição das plantas e severidade da doença. E finalmente, no Capítulo 4 é descrita a avaliação de cerca de 100 acessos de tomateiro da coleção de germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ quanto à resistência às três raças do patógeno. Entre os principais resultados obtidos pode-se destacar a constatação de ocorrência generalizada da raça 3 de FOL na região e a confirmação de que a maioria das cultivares plantadas são suscetíveis a esta raça. Constatou-se, ainda, que as práticas de manejo adotadas pelos produtores contribuem para a disseminação e sobrevivência do patógeno e para seleção da raça 3 devido ao uso de cultivares resistentes às raças 1 e 2. Por fim, na avaliação dos acessos de tomateiro da UFRRJ, identificaram-se cinco acessos resistentes às raças 1 e 2 de FOL e nenhum acesso resistente à raça 3.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. Agricultura familiar. Variedades diferenciadoras. PCR. Fertilidade do solo.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Cristiana Maia de. ***Fusarium* wilt on tomato, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, in Nova Friburgo, RJ: races, genetic resistance and management.** 2017. 142p. Thesis (Doctorate in Agronomy, Crop Science). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Among the main diseases which affects tomato plants there is *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). Control of this disease is difficult due to the farmer's specialization in the crop, pathogen ability to survive in the soil for long periods and physiological specialization of the pathogen in races. Three races of the pathogen have been described in Brazil, 1, 2 and 3, being the 3 of more restricted occurrence. The main strategy to control this disease is the use of resistant cultivars to the races present in the region. Nova Friburgo, RJ, an important tomato producing region during the summer, shows serious problems with plant diseases caused by common soil pathogens and soil management. For this reason, the present work was developed based on the collection of soil and plants samples in 41 farm family units, aiming to study different aspects related to *Fusarium* wilt in the region. The presentation of the work and the results obtained was divided into four chapters. In Chapter 1, a survey on the occurrence of the disease in the farm unities and identification of the predominant races was presented. In Chapter 2, studies on the incidence and distribution of the disease, as well as, evaluation of the most planted cultivars for resistance to the three races of FOL was presented. In the Chapter 3, we have showed studies on the management practices adopted by the farmers and their relations with soil fertility, plant nutrition and disease severity. Finally, in Chapter 4, 100 tomato accessions were evaluated regarding cultivar resistance to the three races of the pathogen. The accessions were obtained in the germplasm collection of the Department of Crop Science of the UFRRJ. Among the main results, we could identify the generalized occurrence of race 3 of FOL in the region, as well as, that most of the planted cultivars are susceptible to this race. The management practices adopted by the farmers contribute to the dissemination and survival of the pathogen the selection of race 3 due to the use of resistant cultivars to races 1 and 2 only. Finally, from the tomato accessions evaluated, five were resistant to races 1 and 2 of FOL and no resistant access to race 3 was identified.

Key words: *Solanum lycopersicum*. Family farming. Differential cultivars. PCR. Soil fertility.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores desenhados por Lievens et al. (2009), Van der Does et al. (2008), Hirano e Arie (2006) e Gonçalves (2015) para a diferenciação das raças 1, 2 e 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> e de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	27
Tabela 2. Padrão esperado na identificação de raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (FOL) por reação de cadeia polimerase com iniciadores específicos de acordo com Lievens et al. (2009) e Van der Does et al. (2008).	28
Tabela 3. Padrão esperado na identificação de raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (FOL) por reação de cadeia polimerase com iniciadores específicos de acordo com Hirano e Arie (2006).	29
Tabela 4. Identificação dos isolados e respectivas informações quanto ao local da coleta, cultivar, condição da planta quanto à intensidade da doença por ocasião da coleta, expressa pela porcentagem de infecção do sistema vascular, e resultado do teste de patogenicidade em tomateiro e espécie de <i>Fusarium</i> identificada (continua).	30
Tabela 5. Reação de série de variedades diferenciadoras de tomateiro a três isolados de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	32
Tabela 6. Efeito do isolado sobre a porcentagem de infecção vascular (PIV) da série de cultivares diferenciadoras de raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	33
Tabela 7. Correlação entre a taxa de massa fresca da parte aérea (TXMF) e porcentagem de infecção vascular (PIV) e escala de notas (Notas).	37
Tabela 8. Identificação dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (FOL). Raça identificada com base em inoculação em variedades diferenciadoras, por PCR utilizando o conjunto de iniciadores de Van der Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009) e de Hirano e Arie (2006) e comparação com sequências depositadas no Genbank- NCBI.	38
Tabela 9. Alinhamento de parte da sequência do gene <i>SIX 3</i> encontrado em isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	41
Tabela 10. Genótipos avaliados quanto à resistência às raças 1, 2 e 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , empresa comercializadora e informação sobre a resistência às raças do patógeno (continua).	53
Tabela 11. Efeito de genótipo sobre a massa fresca relativa da parte aérea (MFR), crescimento relativo das mudas (CR), porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) e classificação quanto à resistência às raças 1, 2 e 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	61
Tabela 12. Média, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos de atributos do solo nos dois grupos de plantas formados por análise de agrupamento, Grupo 1 e Grupo 2 (G1 e G2), das áreas amostradas para a influência sobre a murcha-de-fusário em tomateiro.	87

Tabela 13. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre dados de severidade da doença, avaliada com base em escala de notas (N), porcentagem de infecção vascular (I%) e desenvolvimento da planta, expresso em massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz (MFR), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR), obtidos em mudas de diferentes genótipos de tomateiro inoculadas com quatro isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , MMBF 01/96 (raça 1), MMBF 02/96 e MMBF 152/12 (raça 2) e FUS 2903 (raça 3).....	105
Tabela 14. Esquema comparativo da resistência dos acessos as raças 1 e 3 (FUS 2903) de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , onde N corresponde a notas e I a porcentagem de infecção do sistema vascular, classes de reação segundo a escala de Reis et al. (2004) e grupo pertencente segundo análise estatística por Mahalanobis (continua).	107
Tabela 15. Esquema comparativo da resistência dos acessos as raças 2 (MMBF 02/96 e MMBF152/12) de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , onde N corresponde a notas e I a porcentagem de infecção do sistema vascular, classes de reação segundo a escala de Reis et al. (2004) e grupo pertencente segundo análise estatística por Mahalanobis (continua).	109
Tabela anexo 1. Caracterização de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> isolados de tomateiros de propriedades agrícolas comerciais de Nova Friburgo, Rio de Janeiro e isolados controle sabidamente pertencentes as raças 1 (MMBF 01/96) e 2 (MMBF 02/96 e MMBF 152/12) (continua).....	132
Tabela anexo 2. Análise de variância para porcentagem de infecção do sistema vascular (% I) para os isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> isolados de tomateiros de Nova Friburgo, RJ.	134
Tabela anexo 3. Análise de variância para perda de massa fresca (MFR), redução no crescimento das mudas (RC) e porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) para o isolado MMBF 01/96 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , raça 1.....	134
Tabela anexo 4. Análise de variância para perda de massa fresca (MFR), redução no crescimento das mudas (RC) e porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) para os isolados MMBF 02/96 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , raça 2.....	134
Tabela anexo 5. Análise de variância para perda de massa fresca (MFR), redução no crescimento das mudas (RC) e porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) para o isolado FUS 2903 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , raça 3.....	134
Tabela anexo 6. Validação cruzada realizada pela análise discriminante.....	135
Tabela anexo 7. Questionário aplicado aos produtores de Nova Friburgo, RJ (continua)....	136
Tabela anexo 8. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 99 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 1 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.	138

Tabela anexo 9. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 99 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 2 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.	138
Tabela anexo 10. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 100 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 2 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.	139
Tabela anexo 11. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 102 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.	139
Tabela anexo 12. Análise química do solo da região de desenvolvimento das raízes das plantas de tomateiro coletadas para avaliação quanto a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . Nova Friburgo, 2015.	140
Tabela anexo 13. Informações quanto ao código, grupo e origem da coleção de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ utilizada no trabalho de tese (continua).	140

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma das atividades realizadas. Coleta do material vegetal em propriedades agrícolas em Nova Friburgo, RJ, avaliação dos sintomas através da medição da necrose vascular, processo de isolamento direto em meio de cultura e teste de patogenicidade....23
- Figura 2.** A e B) Placas de Petri com amostras das culturas de isolados identificados como sendo de *Fusarium* sp.; C) Detalhe do teste de patogenicidade.30
- Figura 3.** Porcentagem de infecção do sistema vascular de plantas das variedades Ponderosa, Caline IPA-7 e Floradade inoculadas com os isolados MMBF 01/96, MMBF 02/96 e MMBF 151/12 de FOL (A) e reação das respectivas diferenciadoras a estes três isolados (B).32
- Figura 4.** Reação da série de cultivares diferenciadoras aos 27 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, expresso pela nota com base em escala de Santos (1997) e resultado das médias das notas avaliadas segundo Reis et al. (2004).....34
- Figura 5.** Perda de massa fresca (PMF) das cultivares diferenciadoras de raças fisiológicas e da cultivar Serato, inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em relação ao controle.....36
- Figura 6.** Árvore filogenética baseada na sequência SIX3 de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, calculado pelo método UPGMA. Realizado com o programa MEGA 7. A análise envolveu 26 sequências de nucleotídeos. Significância é indicada pelo valor de bootstrap em 1000 repetições. A escala representa o número de substituição a cada 100 nucleotídeos. 14844 e IPO3- outros isolados de FOL identificados quanto a raça, cujas sequências estão disponíveis no Genbank.42
- Figura 7.** Severidade média da doença medida pela porcentagem de infecção, PIV, do sistema vascular e escala de notas, N (REIS et al., 2004), onde: 1,0- semelhante a imune (SI); 1,1 a 2,0- altamente resistente (AR); 2,1 a 3,0- medianamente resistente (MR), 3,1 a 4,0- suscetível (SU) e; 4,1 a 5- altamente suscetível (AS).....57
- Figura 8.** Cultivares diferenciadoras de raça de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inoculadas com a raça 3 (FUS 2903), coletado em Nova Friburgo, RJ, em condições de casa de vegetação.59
- Figura 9.** Unidades agrícolas familiares produtoras de tomate em Nova Friburgo, RJ.....73
- Figura 10.** Levantamento das unidades agrícolas em Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, Nova Friburgo, RJ, quanto ao histórico de uso da área e práticas de manejo adotadas na cultura do tomateiro no ano de 2015.....77
- Figura 11.** Levantamento das unidades agrícolas em Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, Nova Friburgo, RJ, quanto ao histórico de uso da área e práticas de manejo adotadas na cultura do tomateiro no ano de 2015.....80
- Figura 12.** Análise de componente principal (ACP) referente aos dados de solo, desenvolvimento das plantas de tomateiro e infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp.

<i>lycopersici</i> . A) Declividade e fertilidade x porcentagem de infecção; B) Teores de areia, matéria orgânica, CTC x porcentagem de infecção; C) acúmulo de nutrientes e de Al nas plantas x porcentagem de infecção; D, E e F) acúmulo de Cu, Zn e Mn nas folhas, caule e raiz, respectivamente x porcentagem de infecção (continua).	83
Figura 13. Dendrograma relacionado à análise de agrupamento a partir dos valores de pH, Ca, Mg, K, Al, capacidade de troca catiônica (CTC), matéria orgânica (MO) e argila das 241 amostras de solo coletadas em Nova Friburgo, RJ estabelecidas pelo método de Ward e distância Euclidiana.	85
Figura 14. Média padronizada de: A) % de infecção das plantas coletadas, Idade da planta e % de suscetibilidade das cultivares comerciais utilizadas por produtores da região; B) Atributos do solo; C) Nitrogênio acumulado em folha e caule (mgN/gms); Massa seca de folha, caule e raiz e; massa fresca de folha, caule e raiz; D) Nitrogênio (N), Alumínio (Al), Cálcio (Ca); Magnésio (Mg), Potássio (K) e Fósforo (P) acumulado em folha, caule e raiz e; E) Zinco (Zn), Manganês (Mn), Cobre (Cu) acumulados em folha caule e raiz nos dois grupos (G1 e G2) formados através de análise de agrupamento.	86
Figura 15. Quantidades médias de Nitrogênio (A); Alumínio (B); Cálcio (C); Magnésio (D) e; Fósforo (E) acumulados em folha, caule e raiz e soma destes nas plantas de tomateiro.	88
Figura 16. Condução em casa de vegetação de acessos quanto a resistência a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . A) Raça 1 (MMBF 01/96). B) Raça 2 (MMBF 02/96 e MMBF 152/12) e; C) Raça 3 (FUS 2903).	102
Figura 17. Porcentagem de infecção do sistema vascular (I%) observada em diferentes amostras de plantas e correspondentes notas de severidade (SANTOS, 1997; REIS et al., 2004), observadas em 100 acessos de tomateiro inoculados com quatro isolados de três diferentes raças <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> : A) MMBF 01/96 (raças 1); B) MMBF 02/96 (raça 2); C) MMBF 152/12 (raça 2) e D) FUS 2903 (raça 3).	106
Figura 18. Análise da componente principal de genótipos de tomateiro do Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ quanto a resistência a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , baseado na severidade (Notas), porcentagem de infecção vascular (I%), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR). A) Raça 1 (MMBF 01/96); B) Raça 2 (MMBF 02/96); C) Raça 2 (MMBF 152/12) e; D) Raça 3 (FUS 2903).	113
Figura 19. Frequência de classes de reação Segundo escala de Santos (1997) e Reis et al. (2004) de cerca de 100 acessos de tomateiro a isolados das raças fisiológicas 1, 2 e 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	114
Figura anexo 1. A) Primer ITS 4 e ITS 5. B) Primer SIX3. Presença ou ausência de 608-bp do produto amplificado. C) Primer SIX4. Presença ou ausência de 967-bp do produto amplificado. D) SIX3-G121A-F2. Presença ou ausência de 429-bp do produto amplificado. E) Primer uni. Presença ou ausência de 670~672-bp do produto amplificado; F) Primer sp13. Presença ou ausência de 445-bp do produto amplificado. G) Primer sp23. Presença ou ausência de 518-bp do produto amplificado; H) Primer sprl. Presença ou ausência de 947 bp do produto amplificado. Marcador 100bp.	126

Figura anexo 2. Exemplo de resultado do alinhamento da região amplificada SIX3, para o isolado FUS 0903 coletado em Nova Friburgo, ao qual apresentou similaridade de 100% com <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> FOL-MM10, raça 3.	127
Figura anexo 3. Mapa representativo do número de plantas infectadas por <i>Fusarium</i> sp. identificados na região de Nova Friburgo, RJ.	127
Figura anexo 4. Mapa representativo do número de plantas infectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> identificados na região de Nova Friburgo, RJ.	128
Figura anexo 5. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 99 e 102 genótipos de tomateiro, construído pelo método “UPGMA”, com base em seis caracteres, a partir da distância generalizada de Mahalanobis (D^2). A) Raça 1 (MMBF 01/96) e B) Raça 3 (FUS 2903).	129
Figura anexo 6. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 99 e 100 genótipos de tomateiro, construído pelo método “UPGMA”, com base em seis caracteres, a partir da distância generalizada de Mahalanobis (D^2). A) Raça 2 (MMBF 02/96) e B) Raça 2 (MMBF 152/12).	130
Figura anexo 7. Etapas do processo de inoculação. A) Produção de mudas de tomateiro; B) muda destacada da sementeira para lavagem e retirada do excesso de substrato aderido as raízes; C) corte da porção apical da raiz; D) imersão das plantas na suspensão de esporos; E) transplântio para tubetes e; F) adição da suspensão de esporos ao colo de cada planta com auxílio de um pipetador automático.	131
Figura anexo 8. Sintomas típicos da murcha-de-fusário em tomateiro causada por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> . A e B) Murcha, amarelecimento e necrose nas folhas e; C) descoloração no sistema vascular.	131

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Aspectos Gerais Sobre a Cultura do Tomateiro	3
2.2	Murcha-de-Fusário do Tomateiro.....	4
2.3	Identificação de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	5
2.4	Métodos de Controle.....	6
2.4.1	Cultivares resistentes	6
2.4.2	Controle biológico	7
2.4.3	Controle químico	8
2.5	Produção Agrícola da Região de Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro	8
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	10
	CAPITULO I	17
	IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE ISOLADOS DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> OBTIDOS DE TOMATEIROS EM NOVA FRIBURGO, RJ.....	17
	RESUMO.....	18
	ABSTRACT	19
1	INTRODUÇÃO.....	20
2	MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1	Coleta e Caracterização Inicial dos Isolados.....	23
2.2	Caracterização de Isolados Empregados como Padrão para as Raças 1, 2 e 3 de FOL.....	24
2.3	Identificação de Raças de FOL por Inoculação em Variedades Diferenciadoras	24
2.4	Caracterização das Raças de FOL por PCR Convencional e Sequenciamento Gênico	25
2.4.1	Caracterização com conjunto de iniciadores de Van der Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009).....	28
2.4.2	Caracterização de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> utilizando conjunto de iniciadores do trabalho de Hirano e Arie (2006).....	28
2.4.3	Caracterização de isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> utilizando iniciadores de Gonçalves (2015).....	29
2.4.4	Identificação molecular por sequenciamento do DNA dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	29
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1	Origem dos Isolados.....	30
3.2	Caracterização de Isolados para Padrão de Raças de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	32
3.3	Caracterização dos Isolados Quanto à Raça Fisiológica	33
3.3.1	Cultivares diferenciadoras	33
3.3.2	Diferenciação de raças por qPCR Convencional.....	37
3.3.2.1	Caracterização molecular dos isolados de FOL com o conjunto de iniciadores de Van de Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009)	37
3.3.2.2	Caracterização molecular dos isolados de FOL com o conjunto de iniciadores de Hirano e Arie (2006).....	39

3.3.2.3 Caracterização de isolados de FOL utilizando iniciadores do trabalho de Gonçalves (2015).....	40
3.3.3 Identificação molecular baseada no seqüenciamento do DNA dos isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	41
4 CONCLUSÕES.....	43
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
CAPÍTULO II.....	48
AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE TOMATEIRO QUANTO À RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 1, 2 E 3 DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
1 INTRODUÇÃO.....	51
2 MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Levantamento das Cultivares Plantadas e da Incidência de Murcha-de-Fusário	53
2.2 Avaliação das Cultivares mais Plantadas Quanto a Resistência às Raças 1, 2 e 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
4 CONCLUSÕES.....	63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
CAPITULO III	68
MANEJO DO TOMATEIRO EM UNIDADES FAMILIARES DE NOVA FRIBURGO, RJ, E RELAÇÕES COM A MURCHA-DE-FUSÁRIO.....	68
RESUMO.....	69
ABSTRACT	70
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 Levantamento do Manejo Adotado na Região.....	73
2.2 Amostras de Solo e Planta.....	74
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1 Manejo da Cultura do Tomateiro e sua Associação com a Murcha-de-Fusário.....	76
3.2 Relação entre Atributos do Solo e Desenvolvimento da Planta e da Murcha-de-Fusário	82
4 CONCLUSÕES	91
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
CAPÍTULO IV.....	97
CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE TOMATEIRO QUANTO A RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 1, 2 E 3 DE <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	97
RESUMO.....	98

ABSTRACT	99
1 INTRODUÇÃO.....	100
2 MATERIAL E MÉTODOS	102
2.1 Caracterização de Acessos de Tomateiro quanto a Resistência às Raças 1, 2 e 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	102
2.2 Análise Estatística	103
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
3.1 Correlação entre Severidade da Murcha-de-Fusário e Desenvolvimento de Plantas de Tomateiro Inoculadas com Quatro Isolados de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	105
3.2 Caracterização dos Acessos de Tomateiro Quanto a Resistência às Raças 1, 2 e 3 de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	112
4 CONCLUSÕES	119
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	125
7 ANEXOS.....	126

1 INTRODUÇÃO GERAL

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma das hortaliças mais importantes no Brasil e no mundo. Pelo volume produzido e comercializado e grande contingente de mão de obra que emprega em toda sua cadeia produtiva destaca-se como uma cultura de grande importância econômica e social no país. O Brasil é o nono maior produtor mundial, com destaque para os Estados de Goiás (934.658 t), São Paulo (753.283t), Minas Gerais (702.510t) e Rio de Janeiro (189.611t) (IBGE, 2017). No Estado do Rio de Janeiro, o município de Nova Friburgo, localizado na Região Serrana, contribui com 15% da produção (22.706,28t) e abastecimento do mercado no período de entre-safra (EMATER, 2017).

Entre as regiões produtoras do município de Nova Friburgo está a microbacia de Barracão dos Mendes onde se localizam três grandes associações de produtores familiares, Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, que produzem principalmente tomate no período de verão e couve-flor no inverno. A produção é feita em sistema convencional com manejo intensivo e sequenciado do solo e alto uso de insumos químicos o que resulta em processos erosivos, agravados pela topografia acidentada da região, e degradação ambiental (PEREIRA, 2008). O manejo inadequado, aliado às características geográficas, tem levado à degradação do solo, redução de fertilidade e do pH, aumento dos problemas fitossanitários e quedas da produtividade. Os problemas fitossanitários são agravados pela alta suscetibilidade da cultura a uma série de doenças e pragas. Dentre as doenças está a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder e H. N. Hansen (FOL), uma das enfermidades mais danosas e prevalentes em cultivos de tomateiro (AJILOGBA e BABALOLA, 2013; BIJU et al., 2017) e que pode, sob condições favoráveis, levar a 100% de perdas (GONÇALVES, 2015).

O patógeno é um fungo habitante do solo onde sobrevive por vários anos, em restos de cultura devido à formação de esporos de resistência ou clamidósporos. Patógeno específico do tomateiro, penetra nas plantas via sistema radicular e coloniza os vasos do xilema. Com o avanço do processo de colonização, ocorre a obstrução dos vasos reduzindo ou limitando o fluxo de água e nutrientes e, conseqüentemente, resultando em murchas e sintomas de deficiência nutricional e subdesenvolvimento das plantas. Além das murchas, os sintomas característicos da doença são amarelecimento e necrose das folhas, redução do crescimento da planta e, em casos mais severos, morte da planta (GONZALEZ-CENDALES et al., 2016). Em geral, os sintomas aparecem ou se intensificam em plantas em fase de florescimento e frutificação, devido ao aumento da demanda por água e nutrientes (AGRIOS, 2005).

Na população do patógeno já foram identificadas três raças fisiológicas, caracterizadas pela capacidade de infectar variedades específicas portadoras de genes de resistência *I*, *I-1*, *I-2* e *I-3* (BIJU et al., 2017). Além destes genes, tem-se também o gene *I-7* que confere resistência a todas as três raças (GONZALEZ-CENDALES et al., 2016). Estes genes foram identificados em tomateiros silvestres e vem sendo introgrididos em cultivares de tomateiro (BIJU et al., 2017). As raças 1 e 2 estão amplamente disseminadas em plantios de tomateiro pelo mundo enquanto a raça 3 apresenta ocorrência mais restrita. A primeira constatação de FOL raça 3 no Brasil foi feita no Espírito Santo (REIS et al., 2005) e posteriormente a presença dessa raça foi constatada no Rio de Janeiro (REIS e BOITEUX, 2007), na Bahia (BARBOZA et al., 2013) e, mais recentemente, em Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2013).

Recomenda-se para o controle da doença a adoção de medidas preventivas como cultivo em locais sem a presença do patógeno, o uso de sementes e mudas sadias e cuidados com a limpeza de máquinas, implementos e estacas. Em locais onde o patógeno já foi introduzido, preconizam-se práticas culturais como rotação de culturas, destruição de restos culturais,

redução do revolvimento do solo, calagem e manejo adequado da adubação (AJILOGBA e BABALOLA, 2013; DORDJEVIC et al., 2012). O uso de cultivares resistentes, porém é a estratégia mais eficiente, desde que estas possuam genes efetivos contra à(s) raça(s) presentes na área. Para tanto, é necessário a identificação e mapeamento das raças presentes na região e a identificação das cultivares mais adequadas. A maioria das cultivares híbridas hoje disponíveis no mercado são resistentes às raças 1 e 2 de FOL e, somente algumas poucas, à raça 3. Com a rápida dispersão da raça 3 em áreas de produção de tomate no Brasil, a reduzida oferta de cultivares resistentes a esta raça poderá vir a ser um fator limitante à produção de tomate.

Com a finalidade de diagnosticar a importância da murcha-de-fusário, os fatores que mais têm contribuído para o seu estabelecimento e de se identificar as estratégias de manejo mais adequadas para região de Nova Friburgo, RJ, desenvolveu-se o presente trabalho apresentado em quatro capítulos e que teve como objetivos: (1) identificar as raças de FOL presentes na região; (2) avaliar a resistência das principais cultivares utilizadas pelos produtores quanto a resistência às raças 1, 2 e 3 de FOL; (3) avaliar as condições e os sistemas de manejo adotados pelos agricultores da região e, identificar aqueles que possam estar contribuindo para o desenvolvimento da murcha-de-fusário e; (4) avaliar a coleção de acessos de tomateiro da UFRRJ quanto a resistência às raças 1, 2 e 3 de FOL.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais Sobre a Cultura do Tomateiro

O tomateiro, espécie da família *Solanaceae*, é originário da América do Sul, na região compreendida entre o Equador e o Chile, e cultivado, atualmente, em diversas regiões do mundo (BARONE et al., 2009). A família *Solanaceae* contém mais de 2800 espécies dentre as quais o tomate, batata, pimentão, pimentas, tabaco, berinjela e jiló.

O tomateiro foi inicialmente classificado como do gênero *Solanum* por Carl Von Linnaeus. Posteriormente, Miller sugeriu a mudança para o gênero *Lycopersicon*. Contudo, após análises moleculares e morfológicas, o tomateiro voltou a ser classificado como *Solanum lycopersicum* de acordo com o binomial inicialmente proposto por Linnaeus (PERALTA e SPOONER, 2006). O ancestral mais próximo dos tomates cultivados é o tomate cereja silvestre, *S. lycopersici* var. *cerasiforme*, que ocorre em áreas tropicais e subtropicais por todo o mundo (PERALTA et al., 2008). Outros parentes silvestres são *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmanii*, *S. parviflorum*, *S. chmielewskii*, *S. hirsutum* (= *S. habrochaites*), *S. chilense*, *S. pennellii* e *S. peruvianum* (ROBERTSON e LABATE, 2006).

O tomateiro foi introduzido na Europa pelos espanhóis entre 1523 e 1554 (FILGUEIRA, 2008) onde foi cultivado primeiramente como uma planta ornamental e sua aceitação somente passou a correr a partir do final do século XVI (PERALTA et al., 2008). A maior parte dos tomateiros cultivados na América Latina tem sua origem de materiais europeus ou asiáticos e o desenvolvimento de novas cultivares tem sido feito a partir desses materiais (MALUF, 2000).

No Brasil, a sua introdução ocorreu na época da colonização portuguesa no final do século XIX. Contudo seu cultivo somente aconteceu com as imigrações para as regiões sudeste e sul (CEAGESP, 2003). Atualmente, o país é o nono maior produtor de tomate no mundo com produção de 3,7 milhões de toneladas em uma área colhida de 58.339 ha (IBGE, 2017). O sudeste brasileiro teve uma participação de 49% na safra 2016 com produção de 1.799,478 mil toneladas, tendo destaque os Estados de São Paulo e Minas Gerais. O Rio de Janeiro é o terceiro maior produtor desta região com participação de 10,54% (IBGE, 2017).

Por ser originário da região da costa oeste da América do Sul, local onde as temperaturas são moderadas, com médias entre 15 a 19°C, e com precipitações não muito intensas, o tomateiro pode se desenvolver desde o clima tropical de altitude a subtropical e temperado, o que permite seu cultivo em diversas regiões do mundo (SILVA et al., 2006).

De acordo com FILGUEIRA (2008), o tomateiro embora seja uma planta perene, se comporta como anual com ciclo variando de 4 a 7 meses. A floração e a frutificação ocorrem paralelamente com a vegetação. A planta pode apresentar dois tipos de hábito de crescimento o determinado e o indeterminado. No hábito de crescimento determinado há um crescimento vegetativo menos vigoroso e a planta lembra o aspecto de uma moita com a formação de um cacho de flores na extremidade das hastes. Nas plantas de hábito indeterminado ocorre a dominância da gema apical sobre as laterais, características predominantes na maioria das cultivares para a mesa.

O fruto de tomate apresenta de 93% a 95% de água em sua constituição. A fração matéria seca, 5% a 7%, é constituída por compostos inorgânicos, ácidos inorgânicos, açúcares, sólidos insolúveis em alcoóis entre outros (SILVA et al., 2006). São abundantes fontes de micronutrientes antioxidantes como: β caroteno, luteína, γ caroteno, vitamina C, vitamina E e compostos fenólicos que são benéficos à saúde humana (DUMAS et al., 2003).

2.2 Murcha-de-Fusário do Tomateiro

A cultura do tomateiro está sujeita a perdas causadas por várias doenças, dentre estas, a murcha-de-fusário (AGRIOS, 2005). A murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder e H. N. Hansen (FOL) é uma das mais importantes doenças que atingem essa hortaliça (KUROZAWA e PAVAN, 2005). Até hoje já foram descritas três raças fisiológicas de FOL, raças 1, 2 e 3, identificadas de acordo com sua variabilidade genética e capacidade de infectar variedades específicas. As raças 1 e 2 estão distribuídas amplamente em todo o mundo, enquanto que a raça 3 se apresenta geograficamente mais restrita (REIS et al., 2005; REIS et al., 2006). A raça 1 de FOL foi primeiramente registrada no ano de 1886 (BOOTH, 1971), enquanto que a raça 2 foi reportada em 1945 no Estado de Ohio (ALEXANDER e TUCKER, 1945). A raça 3 foi identificada na Austrália no ano de 1978 (GRATTIDGE e OBRIEN, 1982).

No Brasil o primeiro relato da murcha-de-fusário ocorreu no Estado de Pernambuco em 1938 (DESLANDES, 1940 citado por ANDRADE et al., 1999). Contudo, a identificação das raças 1 e 2 foi realizada em São Paulo (ARRUDA 1941; TOKESHI et al., 1966). A possível presença de raça 3 no Brasil foi relatada por Tokeshi et al. (1966), também no Estado de São Paulo, onde um isolado de *Fusarium* T-18-1 foi testado em nove variedades e dez progênies e na espécie *S. pimpinellifolium* (PI 126915-1-8), dita como resistente à raça 3. No entanto, um novo estudo foi conduzido por Noguez e Tokeshi (1974), e o isolado T-18-1, foi reclassificado como pertencente à raça 2.

Relato categórico da raça 3 no Brasil foi obtido em trabalho realizado por Reis et al. (2005), no município de Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo. Posteriormente, essa mesma raça foi identificada em São José de Ubá e Itaocara, Estado do Rio de Janeiro (REIS e BOITEUX, 2007), na Bahia (BARBOZA et al., 2013) e em Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2013). A disseminação de isolados da raça 3, possivelmente, se deu por meio de sementes infectadas e a sua ocorrência nestas regiões pela pressão de seleção pelo plantio de cultivares resistentes às raças 1 e 2 de FOL (REIS et al., 2006).

O patógeno produz três tipos de esporos assexuais, macroconídios, microconídios e clamidósporos. Os microconídios apresentam um a dois septos e são os mais abundantes esporos em diversas condições. Macroconídios possuem de 3 a 5 septos possuindo extremidades curvadas, típico de "*Fusarium*". Os clamidósporos, esporos de resistência, apresentam formato arredondado com uma a duas células e paredes grossas (AGRIOS, 2005). Os clamidósporos podem persistir viáveis no campo por longo período, mesmo na ausência do hospedeiro. Além do clamidósporo, o patógeno pode sobreviver na forma saprofítica em restos de plantas ou no solo por período de sete anos ou mais (GONÇALVES, 2015). Segundo De Cal (1997) os clamidósporos constituem a principal forma de sobrevivência do patógeno e fonte primária de inóculo para início da doença no campo.

Segundo Lagopodi et al. (2002), os eventos relacionados à colonização radicular do tomateiro por *Fusarium* são: primeiro o contato entre patógeno e hospedeiro que ocorre na zona radicular, seguido pela colonização das fissuras ao longo das junções das células epidérmicas onde não há locais específicos de penetração ou estruturas de infecção. Durante este processo o patógeno secreta diversas proteínas que podem ser reconhecidas ou não pela planta hospedeira gerando interações incompatíveis ou compatíveis. Em FOL, estas proteínas são denominadas "*secreted in xylem*" (SIX) e podem ser reconhecidas pela planta desde que contenham genes específicos de resistência, os genes da série *I* (= *Immunity*). As proteínas SIX de FOL estão associadas a diferentes genes de avirulência: *Six4* (*Avr1*) cujo produto gênico é reconhecido por *I* e o gene não alélico *I-1*; *Six3* (*Avr2*) é reconhecido por *I-2* e, *Six1* (*Avr3*) é reconhecido por *I-3* (HOUTERMAN et al., 2008; HOUTERMAN et al., 2009).

O patógeno pode infectar as plantas em diferentes estádios, desde plântulas e mudas a plantas adultas. Em mudas, os sintomas externos são caracterizados com a epinastia das folhas mais velhas, murchamento e por fim morte. No campo, a infecção pode ocorrer em qualquer fase, contudo o aparecimento dos sintomas se torna mais evidente no início da fase de maturação dos frutos, com amarelecimento das folhas inferiores que aos poucos murcham e morrem (KUROZAWA e PAVAN, 2005; MCGOVERN, 2015). Outros sintomas relacionados são aparecimento ocasional de raízes adventícias, murcha de folhas e caules jovens, desfolha e necrose marginal das folhas restantes. Os frutos, em menor frequência, podem ser infectados resultando em apodrecimento e queda, sem apresentar manchas (AGRIOS, 2005). A melhor forma de visualização e identificação da infecção por murcha-de-fusário pode ser feita através do corte transversal do caule do tomateiro, onde se observa uma coloração marrom intensa na região do xilema (KUROZAWA e PAVAN, 2005).

A murcha e morte das plantas é causada pela combinação de dois fatores: crescimento do fungo no sistema vascular (incluindo produção de toxinas) e pela produção de estruturas de defesa da planta hospedeira, as tiloses, que bloqueiam o transporte de água e nutrientes nos vasos do xilema (GONZALEZ-CENDALES et al., 2016). Com a morte da planta, o fungo persiste colonizando os restos culturais onde forma os clamidósporos. Estes podem ser transportados para outras áreas através de sementes, solo, água, material contaminado e maquinário agrícola (AJILOGBA e BABALOLA, 2013).

Os fatores ambientais que mais influenciam o processo de infecção e colonização pelo patógeno e a resistência das plantas estão relacionados à nutrição, temperatura (MICHEREFF et al., 2005) e umidade (KEIKO, 1980). De acordo com Keiko (1980), a ocorrência de infecção é favorecida por temperaturas entre 21°C e 33°C, com ótimo desenvolvimento a 28°C. Fatores como baixo pH do solo e uso de fertilizantes a base de amônio também contribuem para o aumento da severidade da doença (MCGOVERN, 2015).

Em relação aos nutrientes, estes podem induzir tolerância ou resistência na espécie hospedeira, podem reduzir ou aumentar a severidade de doenças, além de afetar o ambiente favorecendo ou desfavorecendo o patógeno e a própria planta. A aplicação de nitrogênio na forma de nitrato pode reduzir a infecção por FOL por gerar um pH neutro a alcalino, enquanto que a aplicação de nitrogênio na forma de amônia favorece a infecção por gerar pH ácido. Nutrientes como K, Ca, Mg, S, Mn e B diminuem a suscetibilidade a *Fusarium* (CARVALHO et al., 2005; ZAMBOLIM et al., 2005). A presença de nematoides das galhas (*Meloidogyne* spp.) no solo e capinas são fatores que também podem contribuir para uma maior severidade da doença por causarem ferimentos nas raízes e facilitar a entrada do patógeno (AJILOGBA e BABALOLA, 2013).

2.3 Identificação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

O fungo é pertencente ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Nectriaceae e gênero *Fusarium* (LESLIE e SUMMERELL, 2006). A espécie *Fusarium oxysporum* causa infecção vascular e murchas em diferentes espécies hospedeiras. No entanto, dentro da espécie fúngica existe uma alta especialização a nível de espécies hospedeira, distinguíveis como *formae speciales* (abreviado f. sp.). As diferentes *formae speciales* de *F. oxysporum* são morfológicamente muito semelhantes e não distinguíveis exceto a nível molecular e pela virulência a nível de espécie hospedeira (LESLIE e SUMMERELL, 2006). Segundo estes autores, já foram descritas mais de 100 *formae speciales* de *F. oxysporum*. Outra especialização é denominada como raça, sendo definida como a capacidade de causar ou não doença em cultivares específicas (SCHUMAN e D'ARCY, 2006 citado por SOUZA et al., 2010). A classificação das raças é realizada com

base em um conjunto de cultivares diferenciadoras, portadoras de genes específicos de resistência (HENRIQUE et al., 2015).

No tomateiro são relatadas duas formas especializadas de *F. oxysporum*: *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) causador da murcha-de-fusário e *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) que causa podridão de raiz e coroa, ainda não relatado no Brasil. FORL está na lista de pragas quarentenárias (A1) do MAPA (MAPA, 2017). Estes dois patógenos são diferenciáveis pelo tipo de sintoma que causam, pelas condições de ambiente mais favorável à infecção e por técnicas moleculares (BOIX-RUÍZ et al., 2015).

A identificação da presença de *Fusarium* em plantas é feita em diferentes etapas: relato dos sintomas causados, condições de ambiente que propiciam a infecção; observação dos protocolos de isolamento; purificação do isolado e avaliação de caracteres morfológicos, moleculares e fertilidade cruzada (LESLIE e SUMMERELL, 2006). A identificação morfológica é feita com base na forma e abundância das estruturas reprodutivas, fiálides, microconídios, macroconídios e clamidósporos e nas características da colônia como cor, textura e aroma (NELSON et al., 1983). Contudo devido às similaridades existentes entre os isolados de *Fusarium* spp. este trabalho é dificultado (STEENKAMP et al., 2000). Como a forma especializada e as raças são indistinguíveis morfológicamente, a utilização de outras abordagens como utilização de cultivares diferenciadoras, descrição da sintomatologia da doença são essenciais (BOIX-RUÍZ et al., 2015). Ao nível de raça de FOL, o uso de variedades e híbridos resistentes é o método mais utilizado para a identificação (REIS et al., 2004). Outro método utilizado é o uso de ferramentas moleculares como marcadores moleculares (HIRANO e ARIE, 2006; LIEVENS et al., 2009; INAMI et al., 2010) e sequenciamento gênico (LIEVENS et al., 2009). Estas ferramentas vêm facilitando o processo de identificação e, quando associado ao uso de variedades diferenciadoras geram resultados mais confiáveis (BOIX-RUÍZ et al., 2015).

2.4 Métodos de Controle

Diversos métodos são utilizados para o controle da murcha-de-fusário: preventivos, em locais com a ausência do patógeno como sanitização de implementos e maquinário e utilização de sementes sadias (AJILOGBA e BABALOLA, 2013); controle químico (AMINI e SIDOVICH, 2010); biocontrole (ROCHA e MOURA, 2013; ROCHA et al., 2017); variedades resistentes (REIS et al., 2011); práticas culturais como irrigação, calagem, uso de matéria orgânica, adubação equilibrada (CARVALHO et al., 2005) e rotação de culturas (AJILOGBA e BABALOLA, 2013). Dentre estas, o uso de cultivares resistentes e as práticas culturais estão entre as mais importantes e utilizadas.

2.4.1 Cultivares resistentes

O uso de cultivares resistentes constitui a forma mais econômica e de fácil utilização além de não causar agressão ao meio ambiente (MCGOVERN, 2015). A maioria das cultivares comercializadas do tomateiro possui resistência às raças 1 e 2 de FOL, contudo poucas possuem resistência à raça 3. Dois tipos de resistência são identificados em plantas contra patógenos: resistência quantitativa (ou parcial, poligênica, horizontal) e qualitativa (ou completa, raça específica, monogênica, gene R). A resistência quantitativa é governada por conjuntos de genes onde a planta produz barreiras físicas e químicas que impedem parcialmente a penetração, infecção e colonização pelo patógeno. Quando infectadas, as plantas apresentam sintomas típicos como murchas, mas muitas vezes menos severos. A resistência qualitativa é específica e envolve um ou poucos genes que impedem o processo de

infecção (AGRIOS, 2005, NIKS et al., 2015). Apesar de ambas as formas de resistência terem sido identificadas contra a murcha de tomateiro, a resistência do tipo qualitativa é a mais utilizada em programas de melhoramento para o desenvolvimento de cultivares comerciais (MCGOVERN, 2015).

Genes de resistência têm sido encontrados na natureza em espécies silvestres e muitos desses genes são simplesmente herdados e transferidos com sucesso para tomateiros cultivados (*Solanum lycopersicum* L.) (BAI e LINDHOUT, 2007). Genes de resistência à raça 1, *I* e *I-1*, foram encontrados em *S. pimpinellifolium* (= *L. pimpinellifolium*) e *S. pennellii* (= *L. pennellii*). O gene *I*, no ano de 1940, foi o primeiro a ser introduzido de parentes silvestres em cultivares visando a resistência à murcha-de-fusário. Resistência à raça 2 (conferida pelo gene *I-2*) foi introduzida em 1960 a partir da espécie *S. pimpinellifolium* (BOHN e TUCKER, 1939) e, resistência à raça 3, genes *I-3* e *I-7*, foram introduzidos a partir de *S. pennellii* acessos 'LA716' e 'PI 414773', respectivamente (LIM et al., 2006).

A identificação de fontes de resistência a FOL é essencial para uso em programas de melhoramento, uma vez que novas raças do patógeno poderão surgir devido à pressão de seleção gerada pelo uso extensivo de determinada cultivar resistente (ANDRADE et al., 2005). Pesquisas que buscam identificar fontes de resistência vem sendo realizadas, como o trabalho de Santos-Júnior et al. (2009), que identificaram dez genótipos do Banco de Germoplasma de Tomate da Embrapa Hortaliças resistentes à raça 3. Reis et al. (2004), encontraram fontes de resistência múltipla em cultivares de tomateiros *S. habrochaites* (= *L. hirsutum*), *S. chilense*, *S. pennellii* e *S. peruvianum*. A partir desse trabalho, no ano de 2013, foi lançada a cultivar BRS-Imigrante híbrido F₁, resistente às raças 1, 2 e 3, desenvolvido em parceria com o INCAPER. Trabalhos adicionais conduzidos por Carrer-Filho et al. (2015) identificaram resistência à raça 3 em acessos de *S. peruvianum* e *S. corneliomuelleri*.

A busca por novas fontes de resistência é essencial em programas de melhoramento visando resistência estável e duradoura. Além disso, a introgressão desses genes em cultivares comerciais ampliaria a base genética do tomateiro e permitiriam a antecipação de problemas potenciais como o surgimento de novas raças do patógeno.

2.4.2 Controle biológico

Por ser uma doença causada por patógeno de solo e de difícil manejo, alternativas como o controle biológico tem sido uma das ferramentas bastante investigadas. Agentes de biocontrole podem proteger a planta por vários mecanismos de ação, desde o antagonismo direto à competição, parasitismo e, ou, antibiose. A indução de resistência na planta ao patógeno também pode ser obtida (SHCHERBAKOVA et al., 2011). Isolados não patogênicos de *F. oxysporum*, podem ser uma alternativa no controle da murcha (SILVA e BETTIOL, 2006). Cepas não patogênicas de *Fusarium* atuam competindo por nutrientes do solo, afetando a taxa de germinação de clamidoconídios do patógeno, competindo por sítios de infecção na raiz, além de desencadear reações de defesa nas plantas (FRAVEL et al., 2003). A indução de resistência genética é caracterizada pela ativação de mecanismos de defesa existentes nas plantas em resposta a infecção por patógenos ou por tratamento com produtos químicos naturais ou sintéticos (CARVALHO, 2012). Como exemplo, trabalho desenvolvido por Gurgel et al. (2005) com acibenzolar-S-metil (ASM) e ácido â-aminobutírico (BABA) e por Amaral et al. (2008) com aplicação via foliar de ácido salicílico para indução de resistência do tomateiro à murcha-de-fusário.

Existem no mercado algumas formulações, como Biofox C (registrado na Itália), que utiliza estirpes não patogênicas de *F. oxysporum* e *F. moniliforme*. Este produto está registrado para controle da doença em manjeriço, cravo e tomateiro e pode ser usado no

tratamento de sementes ou por incorporação no solo. Outra formulação comercial é o Fusaclean, registrado na França, formulado a base de *F. oxysporum*. A formulação é líquida, por isso deve ser aplicado na linha de plantio ou pré-misturado em potes. É indicado para controle da doença na cultura do tomateiro, gérbera, aspargo, manjerição, etc (KAUR et al., 2011).

2.4.3 Controle químico

O controle químico quando comparado aos demais métodos de controle utilizados é menos eficiente, pois o patógeno produz estruturas de resistência, permanecendo no solo e desta forma dificultando seu manejo (JUNIOR et al., 2005). Apesar disso, alguns resultados positivos foram relatados por Amini e Sidovich (2010) com a utilização de formulações prochloraz e bromuconazole.

O controle químico tem como inconvenientes a possibilidade de rápida degradação das moléculas utilizadas no solo e, ou de sua adsorção física ou química, especialmente em solos com alto conteúdo de argila ou matéria orgânica (JUNIOR et al., 2005). Estes produtos podem também causar desequilíbrios na comunidade microbiana do solo e prejudicar a comunidade de microrganismos benéficos, além de criarem condições para o desenvolvimento de estirpes resistentes do agente patogênico (SHANMUGAM e KANAUIA, 2011).

2.5 Produção Agrícola da Região de Nova Friburgo, Estado do Rio de Janeiro

O Estado do Rio de Janeiro é o quinto maior produtor de hortaliças do Brasil (IBGE, 2017). A produção concentra-se principalmente na Região de Nova Friburgo, São José de Ubá, Bom Jardim e Paty de Alferes (EMATER, 2017). Nova Friburgo conta com 3.217 agricultores, composto em grande parte por produtores familiares e meeiros, nos quais 404 produzem tomate. No ano de 2016 a produção da cultura foi 22.706,28 toneladas e uma área colhida de 323,20 ha (EMATER, 2017). O destino da produção segue em sua maior parte para a CEASA-RJ, ponto de concentração física destas mercadorias, que as redireciona para o mercado varejista e consumidores (CARDOSO et al., 2005).

O município de Nova Friburgo, localizado na região Serrana Fluminense, está inserida dentro da Serra do Mar abrangendo o Parque Estadual dos três Picos e a zona urbana (GRISEL e ASSIS, 2012). O clima da região é caracterizado por temperatura média anual na faixa de 18°C e 20°C e precipitação 1200 a 1500 mm e relevo montanhoso e declivoso (RODRIGUES, 2013). A produção hortícola localiza-se principalmente na parte sudoeste onde são produzidos couve-flor, brócolos, repolho, alface, ervilha e tomate (EMATER, 2017). A produção de hortaliças feita em parceria com meeiros é em grande escala e com pouca diversificação. Geralmente, utilizam dois sistemas de cultivo, um baseado na rotação tomate e brássica seguido por leguminosa e outro sistema com sucessões de beterraba, cenoura e brássicas. Produtores familiares diversificam mais os cultivos e, muitas vezes utilizam áreas mais declivosas e sem possibilidade de mecanização. Esses adotam três rotinas: (1) sequência brássicas, salsa e leguminosa no período de dois anos; (2) brássica, tomate e leguminosa também do período de dois anos e; (3) culturas menos expressivas economicamente (GRISEL, 2011).

A região possui como característica o manejo intensivo da cultura e do solo (PEREIRA, 2008) de uso de insumos químicos e mão de obra (PERES e MOREIRA, 2007). O uso crescente de insumos vem sendo feito com o intuito de aumentar a produtividade e reduzir perdas nas safras de frutas e hortaliças, o que acarreta em danos a saúde dos trabalhadores, consumidores e ao meio ambiente (ARAÚJO et al., 2007).

Além do uso de produtos químicos, outras práticas agrícolas são adotadas na região devido a intensificação da produção de hortaliças como: ausência ou encurtamento da rotação de culturas; terras que antes eram de pousio passaram a ser cultivadas todo ano fazendo com que outros métodos fossem usados para a renovação da fertilidade do solo como uso de cama-de-aves e adubos químicos (GRISEL, 2011; BHERING et al., 2017); plantio sucessivo de plantas de uma mesma família (brássicas, solanáceas e umbelíferas) (GRISEL, 2011), aterros e desmatamento de zonas – inadequadas para o cultivo, utilização de sementes híbridas e de alto valor agregado e trabalho de solo com arado de disco (GRISEL e ASSIS, 2012).

O tipo de manejo adotado contribui para a disseminação e desenvolvimento de doenças na região, como exemplo a murcha-de-fusário. De acordo com MICHEREFF et al. (2005), a presença de doenças radiculares são consequência de um solo desequilibrado devido principalmente ao sistema agrícola adotado que leva a uma simplificação ecológica tornando-o suscetível aos fitopatógenos.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plants diseases caused by fungi: vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). **In: Plant Pathology**. 5. ed. Burlington: Elsevier Academic Press, 2005. cap. 11, p. 523-526.
- AJILOGBA, C. F.; BABALOLA, O. O. Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. **Biocontrol Science**, v. 18, n. 3, p. 117-127, 2013.
- ALEXANDER, L. J.; TUCKER, C. M. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Agricultural Research**, v. 70, p. 303-313, 1945.
- AMARAL, D. O. J.; LIMA, M. M. A.; RESENDE, L. V.; SILVA, M. V. Differential gene expression, induced by salicylic acid and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* infection, in tomato. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 43, n. 8, p. 1017-1023, 2008.
- AMINI, J.; SIDOVICH, D. The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 2, p. 172-178, 2010.
- ANDRADE, D. E. G. T.; ASSIS, T. C.; ARAÚJO, I. B.; FERRAZ, E.; MENEZES, M. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e resistência de tomateiro à murcha-de-fusário. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 2, p. 172-190, 2005.
- ANDRADE, D. E. G. T. **Murcha-de-fusário do tomateiro: levantamento da intensidade, amostragem, arranjo espacial, variabilidade de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e seleção de cultivares resistentes**. 1999. 99f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade). Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 1999.
- ARAÚJO, A. J.; LIMA, J. S.; MOREIRA, J. C.; JACOB, S. C.; SOARES, M. O.; MONTEIRO, M. C. M.; AMARAL, A. M.; KUBOTA, A.; MEYER, A. Exposição múltipla a agrotóxicos e efeitos à saúde: estudo transversal em amostra de 102 trabalhadores rurais, Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 115-130, 2007.
- ARRUDA, S. C. Murcha de *Fusarium* do tomateiro. **Biológico**, São Paulo, v. 7, n. 7, p. 122-200, 1941.
- BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1085-1094, 2007.
- BARBOZA, E. A.; CABRAL, C. S.; GONÇALVES, A. M.; REIS, A.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 1, 2013.
- BARONE, A.; DI MATTEO, A.; CARPUTO, D.; FRUSCIANTE, L. High-throughput genomics enhances tomato breeding efficiency. **Current Genomics**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2009.

- BIJU, V. C.; FOKKENS, L.; HOUTERMAN, P. M.; REP, M.; CORNELISSEN, B. J. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 1-20, 2017.
- BHERING, A. S.; CARMO, M. G. F.; MATOS, T. S.; LIMA, E. S. A.; SOBRINHO, N. M. B. A. Soil factor related to the severity of clubroot in Rio de Janeiro. **Plant Disease**, v. 101, n. 8, p. 1345-1353, 2017.
- BOIX-RUIZ, A.; GÁLVEZ-PATÓN, L.; DE CARA-GARCÍA, M.; PALMERO-LLAMAS, D.; CAMACHO-FERRE, F.; TELLO-MARQUINA, J. C. Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 4, p. 471-483, 2015.
- BOHN, G. W.; TUCKER C. M. Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. **Science**, v. 89, n. 2322, p. 603-604, 1939.
- BOOTH, C. **The Genus *Fusarium***. Kew: England. Common-wealth Mycological Institute, 1971. 237p.
- CARDOSO, K. V.; RIBEIRO, L.; BARCELOS, S. Dinamicidade agrícola no Estado do Rio de Janeiro: o caso da floricultura e da horticultura. In: Encontro de grupos de pesquisa-agricultura, desenvolvimento regional e transformações sócioespaciais, 2005. **Anais...**, Rio de Janeiro: I encontro de grupos de pesquisa, 2005. p. 1-28.
- CARRER FILHO, R.; OLIVEIRA, R. M.; DIAS, V. D.; BOITEUX, L. S.; DIANESE, É. D. C., CUNHA, M. G. D. Multiple sources of resistance to *Fusarium* wilt in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1225-1231, 2015.
- CARVALHO, A. O.; JACOB NETO, J.; CARMO, M. G. F. Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 26-32, 2005.
- CARVALHO, N. L. Resistência genética e induzida em plantas cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.7, n.7, p.1379-1390, 2012.
- CEAGESP, Programa Brasileiro de Modernização da Agricultura. **Normas de Classificação do Tomate**. Centro de Qualidade em Horticultura. CQH/CEAGESP, São Paulo, 2003. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/wp-content/uploads/2015/07/tomate.pdf>. Acesso em: 09 fev. 2017.
- DE CAL, A. PASCUAL, S.; MELGAREJO, P. Infectivity of chlamydospores vs *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato. **J. Phytopathology**, v. 145, p. 231-233, 1997.
- DESLANDES, J. A. Doenças do tomateiro no Nordeste. **Boletim da Sociedade Brasileira de Agronomia**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 442-453, 1940.
- DORDEVIC, M.; VATCHEV, T.; GIREK, Z.; SEVIC, M.; ZECEVIC, B.; ZDRAVKOVIC, J.; IVANOVIC, M. Reaction of different tomato cultivars toward race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Genetika**, v. 44, n. 1, p. 109-118, 2012.

DUMAS, Y.; DADOMO, M.; LUCCA, G. D.; GROLIER, P. Effects of environmental factors and agricultural techniques on antioxidant content of tomatoes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 5, p. 369–382, 2003.

EMATER-RIO. **Relatório por culturas do sistema ASPA/AGROGEO – ano 2016 Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://www.emater.rj.gov.br/images/cul2016.htm>. Acesso em: 12 jun. 2017.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 3. ed. rev. e ampl. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2008, 421p.

FRAVEL, D.; OLIVAIN, C.; ALABOUVETTE, C. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. **New Phytologist**, v. 157, n. 3, p. 493–502, 2003.

GONÇALVES, A. D. M.; AGUIAR, F. M.; LOPES, C. A.; FONSECA, M. E. D. N.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; REIS, A. Primeiro registro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 no Estado de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46.; Reunião Brasileira de Controle Biológico, 11., 2013, **Anais...**Ouro Preto: UFV, 2013.

GONÇALVES, A. D. M. **Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro**. 2015. 121f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI, A. M. BAKER, B.; MCGRATH, D. J.; JONES, D. A. Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 448-463, 2016.

GRATTIDGE, R.; OBRIEN, R. G. Occurrence of a 3rd Race of *Fusarium*-Wilt of Tomatoes in Queensland. **Plant Disease**, v. 66, n. 2, p. 165-166, 1982.

GRISEL, P. N.; Avaliação do uso dos serviços ecossistêmicos e capacidades: comparação de dois sistemas de produção hortícola em Nova Friburgo (RJ). **Reeds Working Papers / Cahiers de Reeds**, v. 1, n. 15, p. 1-20, 2011.

GRISEL, P. N.; ASSIS, R. L. Adoção de práticas agrícolas sustentáveis: estudo de caso de um sistema de produção hortícola familiar em ambiente de montanha. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 29, n. 1, p. 133-158, jan./abr. 2012.

GURGEL, L. M. S.; OLIVEIRA, S. M. A; COÊLHO, R. S. B.; SILVA, R. L. X. Proteção à murcha de fusário do tomateiro com acibenzolar-S-metil e ácido α -aminobutírico. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n. 6, p.655-657, 2005.

HENRIQUE, F. H.; CARBONELL, S. A. M.; ITO, M. F.; GONÇALVES, J. G. R.; SASSERON, G. R.; CHIORATO, A. F. Classification of physiological races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in common bean. **Bragantia**, v. 74, n. 1, p. 84-92, 2015.

HIRANO, Y.; ARIE, T. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 5, p. 273-283, 2006.

HOUTERMAN, P. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M. Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 5, p. 1- 6, 2008.

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

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro, Brasil, v. 30, n. 4, p. 1-84, 2017.

INAMI, K.; YOSHIOKA, C.; HIRANO, Y.; KAWABE, M.; TSUSHIMA, S.; TERAOKA, T.; ARIE, T. Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its races. **J Gen Plant Pathol**, v. 76, n. 2, p. 116–121, 2010.

JUNIOR, R. S.; MEDEIROS, E. V.; ANDRADE, D. E. G. T.; PERUCH, L. A. M., RODRIGUES, V. J. L. B. Controle químico de doenças radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T. MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. 2005, 398p.

KEIKO, M. **O tomateiro**. Fundação Cargill, Campinas-SP. 3 ed, 1980. 365p.

KOSKE, R. E.; GEMMA, J. N. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas. **Mycological Research**, v. 92, n. 4, p. 486-488, 1989.

KAUR, R.; KAUR, J.; SINGH, R. S. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. **Plant Pathology Journal**, v. 9, n. 3, p. 79-91, 2011.

KUROZAWA, C.; PAVAN, M. A. Doenças do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. São Paulo. Agronômica Ceres, v. 2, n. 4, p. 607-626, 2005.

LAGOPODI, A. L.; RAM, A. F.; LAMERS, G. E.; PUNT, P. J.; VAN DEN HONDEL, C. A.; LUGTENBERG, B. J.; BLOEMBERG, G. V. Novel aspects of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* revealed by confocal laser scanning microscopic analysis using the green fluorescent protein as a marker. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 2, p. 172-179, 2002.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Blackwell Publishing, 2006. 387p.

LIEVENS, B.; HOUTERMAN, P. M.; REP, M. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 300, n. 2, p. 201-215, 2009.

LIM, G. T. T.; WANG, G. P.; HEMMING, M. N.; BASUKI, S.; MCGRATH, D. J., CARROLL, B. J.; JONES, D. A. Mapping the *I-3* gene for resistance to *Fusarium* wilt in tomato: application of an *I-3* marker in tomato improvement and progress towards the cloning of *I-3*. **Australasian Plant Pathology**, v. 35, n. 6, p. 671-680, 2006.

MALUF, W. R. Melhoramento genético do tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). In: MALUF, W. R. **Melhoramento Genético de Hortaliças**, Lavras: UFLA, 2000. 183 p.

MAPA. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Instrução normativa MAPA 41/2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/sanidade-vegetal/arquivos-quarentena/lista-de-pragas-quarentenarias-ausentes-e-presentes.pdf/view>. Acesso em: 02 Ago 2017.

MCGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78-92, 2015.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. 2005, 398p.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania State University, University Park. 1983, 193p.

NIKS, R. E.; QI, X.; MARCEL, T. C. Quantitative resistance to biotrophic filamentous plant pathogens: concepts, misconceptions, and mechanisms. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 445-470, 2015.

NOGUEZ, M. A.; TOKESHI, H. Revisão da classificação da raça 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*). **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 31, p. 419-430, 1974.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M. History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). In: RAZDAN, M. K.; MATTOO, A. K. **Genetic Improvement of Solanaceous Crops: Tomato**, v. 2, 2006. p. 1-25.

PERALTA, I. E.; SPOONER, D. M.; KNAPP, S.; ANDERSON, C. Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; *Solanaceae*). **Systematic Botany Monographs**, v. 84, p. 1-186, 2008.

PEREIRA, R. R. Agricultura familiar na região serrana fluminense-RJ- Problemática ambiental e pluriatividade: estudo de caso do distrito de São Pedro da Serra- Nova Friburgo. **Semina: Ciências Sociais e Humanas**, v. 29, n. 1, p. 51-60, 2008.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 44, p. 612-621, 2007.

REIS, A.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 495-502, 2004.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 4, p. 426-428, 2005.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; URBEN, A. F.; COSTA, H. Estabelecimento e caracterização a nível de raça de uma coleção de isolados *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, DF, n. 19, p. 1-14, 2006.

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

ROCHA, F. Y. O.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA, P. R. A.; MELO, L. H. V.; CARMO, M. G. F. C.; BALDANI, J. I. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied Soil Ecology**, v. 120, p. 8-19, 2017.

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

RODRIGUES, C. S. **Mapeamento de suscetibilidade a escorregamentos de Nova Friburgo-RJ por meio de inferência fuzzy e elaboração de cenários de alerta com uso da terra**. 2013. 113f. Dissertação (Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Sensoriamento Remoto), Instituto Nacional de Pesquisas espaciais, São José dos Campos, 2013.

ROBERTSON, L. D.; LABATE, J. A. Genetic resources of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and wild relatives. In: RAZDAN, M.K.; MATOO, A.K. **Genetic Improvement of Solanaceous Crops**, 2 ed. 2006. cap. 2, p. 25-76.

SANTOS JÚNIOR, W. N.; CARVALHO, M. R. M.; CABRAL, C. S.; REIS, A. Seleção de híbridos e acessos de tomate para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Hortaliças, 2009. 19p.

SCHUMAN, G. L.; D'ARCY, C. J. **Essential Plant Pathology**. St. Paul: APS Press. 2006. 338p.

SHANMUGAM, N.; KANOUIA, N. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. **Biological Control**, v. 57, n. 2, p. 85-93, 2011.

SHCHERBAKOVA, L. A.; NAZAROVA, T. A.; MIKITYUK, O. D.; FRAVEL, D. R. *Fusarium sambucinum* isolate FS-94 induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato via activation and priming of a salicylic acid dependent signaling system. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 58, n. 5, p. 808-818, 2011.

SILVA, J. C.; BETTIOL, W. Possibilidade de controle da murcha de *Fusarium* do tomateiro com isolados de *Fusarium oxysporum* não patogênico. **Comunicado Técnico**, Embrapa Meio Ambiente, n. 36, 2006. 4p.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L. S.; FRANÇA, F. H.; VILLAS BÔAS, G. L.; BRANCO, M. C.; MEDEIROS, M. A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W. L. C.; LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.; NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, W. **EMBRAPA HORTALIÇAS**. Cultivo de tomate para industrialização. Versão eletrônica, dez./2006. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>. Acesso em: 28 mar. 2013.

SOUZA, L. T.; MICHEREFF, S. J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, D. E. G. T.; FERRAZ, E.; LIMA, G. S. A.; REIS, A. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 102-106, 2010.

STEENKAMP, E. T.; BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 3, p. 187-193, 2000.

TOKESHI, H., GALLI, F.; KUROZAWA, C. Nova raça de *Fusarium* do tomateiro em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 23, p. 217-227, 1966.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. Nutrição Mineral e Patógenos Radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T. MENEZES, M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Universidade Federal de Pernambuco. Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia. 2005. Cap. 7, p. 153-181.

CAPITULO I

IDENTIFICAÇÃO DE RAÇAS DE ISOLADOS DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* OBTIDOS DE TOMATEIROS EM NOVA FRIBURGO, RJ

RESUMO

A murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) é uma das principais doenças da cultura do tomateiro. Até o momento já foram identificadas três raças fisiológicas do patógeno, 1, 2 e 3, que se encontram distribuídas em diferentes regiões do mundo, inclusive no Brasil. No município de Nova Friburgo, Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, há muitos anos produz-se tomate no período de verão, em áreas de agricultores familiares que relatam sérios problemas de perdas devido às murchas. O presente trabalho teve por objetivo diagnosticar a doença na região e identificar as raças predominantes. Coletaram-se 247 plantas de tomateiro, em 41 unidades familiares em 2014 e 2015. Estas foram avaliadas quanto à presença de murcha-de-fusário por meio de diagnose visual, isolamentos e avaliação em microscopia ótica. Todos os isolados identificados como sendo de FOL foram preservados e avaliados quanto à virulência e raça. A identificação das raças foi feita utilizando-se: (a) uma série de variedades diferenciadoras; (b) molecularmente com três conjuntos de iniciadores específicos e; (c) sequenciamento gênico. Obtiveram-se 38 isolados de *Fusarium* sp., sendo 24 destes (63,2%) identificados como sendo de FOL, e todos estes da raça 3, segundo os resultados das inoculações nas variedades diferenciadoras e pelo sequenciamento. Os iniciadores específicos para segmento dos genes da série SIX – “*secreted in xylem*” (SIX3, SIX4 e SIX3-G12A-F2) não foram eficientes na diferenciação das raças 1, 2 e 3 de FOL. Os iniciadores uni, sp12, sp23 e sprl assim como o sequenciamento gênico do amplicon correspondente ao gene *Six3* permitiu a identificação da raça 3, mas não permitiu a diferenciação entre as raças 1 e 2. O sistema marcador SCAR OP-Z4 não permitiu identificar os isolados brasileiros da raça 2. Conclui-se que a raça 3 está amplamente disseminada na região estudada e que existem divergências e dificuldades em se identificar isolados brasileiros de FOL com os conjuntos de iniciadores SIX.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. Murcha-de-fusário. Raça 3. Cultivares diferenciadoras. Iniciadores SIX.

ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) is one of the main diseases which affect tomato plants. Three races (races 1, 2 and 3) of the pathogen have been described around the world, including in Brazil. Nova Friburgo, Rio de Janeiro State, is one of the main tomato producing region. During summer, farmers have reported several losses with plant disease caused by wilt. The present work aimed to identify and characterize the disease and predominant FOL races present in this region. The study was conducted in 41 family units totalizing 247 tomato plants harvested during the years of 2014 and 2015. *Fusarium* wilt was identified based in visual diagnosis, isolation and microscopy tests. Isolates identified as FOL were preserved and evaluated in relation to virulence and race specificity. Race identification was performed using: (a) differential cultivars; (b) molecular method and (c) gene sequencing. From all the isolates obtained, 38 were characterized as *Fusarium* sp. and 24 (63,2%) were identified as race 3 of FOL. Gene sequencing using primers SIX – (SIX3, SIX4 and SIX-G12A-F2) were not efficient to characterize races 1, 2 and 3 of FOL. Primers uni, sp12, sp 23, spr1, as well as, primer SIX3 allowed to identify only race 3. On the other hand, SCAR OP-Z4 marker was not able to identify race 2. The study showed the occurrence of FOL race 3 in Nova Friburgo region. The methodologies used to identify FOL races were divergent among them and showed difficulties to identify Brazilian FOL isolates mainly with SIX primers.

Key words: *Solanum lycopersicum*. *Fusarium* wilt. Race 3. Differential cultivars. SIX primers.

1 INTRODUÇÃO

A produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) sofre grandes perdas em função de doenças causadas por patógenos de solo. Dentre estas, está a murcha-de-fusário, doença distribuída mundialmente e reconhecida como uma das mais importantes da cultura (BIJU et al., 2017). A murcha-de-fusário é causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder e H. N. Hansen (FOL), patógeno habitual de solo e que pode sobreviver em restos de cultura como saprófita e, principalmente, por meio de esporos de resistência, os clamidósporos. O patógeno penetra via sistema radicular e coloniza os vasos do xilema afetando o fluxo de água e nutrientes e, conseqüentemente, causando murchas, subdesenvolvimento e morte das plantas (AGRIOS, 2005). Perdas pela doença têm sido frequentes nas áreas de produção de tomate da região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, responsável pelo abastecimento do mercado no período de verão, mesmo com o uso de cultivares resistentes principalmente as raças 1 e 2 e algumas com resistência as três raças.

Patógenos pertencentes ao grupo *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr., são fungos assexuais de ampla distribuição geográfica, caracterizando-se pela especialização quanto à capacidade de infectar uma ou poucas espécies hospedeiras. Com base nesta especialização é subdividido a nível infra-específico em *formae speciales*. Pode, ainda, com base em sua especialização a variedades específicas da espécie hospedeira, serem divididos a nível de raças (DI PIETRO et al., 2003; MICHIELSE e REP, 2009). Até então já foram identificadas três raças fisiológicas de FOL (denominadas de 1, 2 e 3). A caracterização destas raças é feita com base em sua habilidade em infectar variedades de tomateiro que contenham genes específicos de resistência, *I*, *I-1*, *I-2* e *I-3* (BIJU et al., 2017).

O controle da murcha-de-fusário do tomateiro deve começar com medidas preventivas como uso de sementes e mudas sadias, limpeza de máquinas e implementos, manejo adequado de solo e restos culturais, elevação de pH do solo e, principalmente, uso de cultivares resistentes às raças presentes na área/região. A raça 1 foi descoberta em 1886 por Booth (BOOTH, 1971), a raça 2 em 1945 em Ohio (ALEXANDRE e TUCKER, 1945) e a raça 3, foi identificada em 1978 na Austrália (GRATTIDGE e OBRIEN, 1982). As raças 1 e 2, estão amplamente distribuídas pelo mundo em campos de produção de tomate enquanto a raça 3 possui uma distribuição geográfica mais limitada (REIS et al., 2005). As raças 1 e 2 foram relatadas no Brasil em São Paulo (ARRUDA 1941; TOKESHI et al., 1966), e são de ocorrência generalizada em áreas de cultivo de tomate. A raça 3 foi relatada pela primeira vez no Brasil em 2005 no município de Venda Nova do Imigrante no Estado do Espírito Santo (REIS et al., 2005). Posteriormente, esta raça foi identificada no município de São José de Ubá e Itaocara, RJ (REIS e BOITEUX, 2007), na Bahia (BARBOZA et al., 2013) e mais recentemente, em lavouras comerciais no município de Coimbra, MG (GONÇALVES et al., 2013).

A rápida dispersão da raça 3 nas lavouras de tomate no Brasil, e para áreas geograficamente distantes, provavelmente se deve à sua transmissão via sementes contaminadas (REIS e BOITEUX, 2007). A identificação do patógeno e das raças presentes e de sua distribuição é fundamental para a identificação e recomendação de cultivares resistentes, principal estratégia de controle da doença.

Diversos métodos podem ser utilizados para a identificação e caracterização de espécies de *Fusarium*. O mais simples e rápido é a observação de suas características morfológicas e das colônias em meio de cultura (SUMMERELL et al., 2003) e comparação com as descrições de Booth (1971) e Nelson et al. (1983). A identificação a nível infra-específico como as *formae speciales* e raças, porém não podem ser feitas com base em caracteres morfológicos (AMARAL et al., 2013). Esta caracterização e identificação é feita

tradicionalmente por meio de testes de patogenicidade em espécie e variedades suscetíveis, respectivamente (RECORBET et al., 2003).

Os métodos de caracterização da espécie e das raças de FOL se baseiam em inoculações em série de variedades diferenciadoras de raças, portadoras de genes específicos de resistência (SOUZA et al., 2010; REIS et al., 2005) e, mais recentemente, em métodos moleculares (INAMI et al., 2010; LIEVENS et al., 2009). No Brasil, o uso de cultivares diferenciadoras é o método mais citado na literatura (REIS et al., 2006; REIS e BOITEUX, 2007), sendo que nos últimos anos, análises moleculares também têm sido utilizadas (BARBOZA et al., 2013; GONÇALVES, 2015;).

A identificação com série diferenciadora de raças de FOL utiliza variedades sabidamente portadoras dos genes *I-1*, *I-2* e *I-3*, com destaque para as variedades ‘Ponderosa’ (REIS et al., 2004; SOUZA et al., 2010), ‘IPA-5’ (*I-1*) (REIS et al., 2006), ‘Santa Clara’ (*I-1*), ‘Viradoro’ (*I-1*), ‘Floradade’ (*I-1* e *I-2*), ‘BHRS-2,3’ (*I-7*) (SOUZA et al., 2010) e *S. pennellii* ‘LA-716’ (*I-3*) (REIS et al., 2004). Este método tem como desvantagem, o fato de ser demorado, cerca 36 dias (REIS e BOITEUX, 2007) a 50 a 60 dias (DORDEVIC et al., 2012), desde o semeio, inoculação e obtenção do resultado final, necessitando de espaço para cultivo das mudas pelo referido período e com condições de ambiente adequada para o crescimento da planta e desenvolvimento da doença. Por outro lado, o uso de técnicas moleculares, por serem mais rápidas e precisas, vem se tornando mais frequentes na identificação de FOL e diferenciação de suas raças (AMARAL et al., 2013).

Conjuntos de iniciadores têm sido desenvolvidos para a diferenciação de FOL e para a discriminação de suas raças, tendo por base a especificidade do fungo em infectar a espécie de tomateiro e variedades específicas. Particularmente para *F. oxysporum*, durante o processo de infecção ocorre a produção das chamadas proteínas SIX (“secreted in xylem”) (HOUTERMAN et al., 2009; LIEVENS et al., 2009). Caracterização dessas proteínas em isolados de *F. oxysporum* foi realizada por Lievens et al. (2009). Segundo os autores com o uso das proteínas SIX pode se diferenciar e identificar *formae speciales* e raças de *F. oxysporum*. As formas SIX1, SIX2, SIX3 e SIX5 estão presentes exclusivamente na *formae speciales lycopersici* e são utilizados na sua identificação. SIX4 está presente em isolados de FOL raça 1 e caracteriza esta raça. SIX6 e SIX7 estão presentes em outras *formae speciales* não patogênicas ao tomateiro. A raça 3 é identificada a partir da existência de polimorfismo em SIX3 permitindo diferenciar de isolados da raça 2.

Essa forte ligação entre os genes SIX e patogenicidade em tomateiros os tornam bons marcadores das raças do patógeno. Dessa forma, a presença, ausência ou a combinação desses genes SIX no isolado irá determinar a *formae speciales* e raça do patógeno. Outro método para a identificação de FOL e de suas raças é baseado nos polimorfismos de genes codificadores de enzimas de degradação da parede celular, endopoligalacturonase e exopoligalacturonases (HIRANO e ARIE, 2006). O uso de algumas dessas técnicas, biológicas ou moleculares, se baseiam na necessidade ou na disponibilidade do método, contudo resultados oriundos de ambos os métodos devem ser combinados, uma vez que as respostas podem ser variáveis (BOIX-RUÍZ et al., 2015).

A resistência do tomateiro às raças de FOL está condicionada à capacidade de reconhecer proteínas específicas produzidas pelas respectivas raças do patógeno – *Six4* (*Avr1*), reconhecida pelos genes *I* e *I-1* (HOUTERMAN et al., 2008), *Six3* (*Avr2*), reconhecida pelo gene *I-2* (HOUTERMAN et al., 2009), sendo que *Six4* (*Avr1*) suprime a resistência mediada pelos genes *I-2* e *I-3* (HOUTERMAN et al., 2008). A proteína codificada pelo gene *Six1* (*Avr3*) é reconhecida pelo gene *I-3* (REP et al., 2004).

Dessa forma, tendo em vista a ocorrência de murcha-de-fusário na principal área de produção de tomate na região no período de verão no Estado do Rio de Janeiro, mesmo com o uso de cultivares resistentes às raças 1 e 2, realizou-se este trabalho com o objetivo de

identificar as variantes fisiológicas do patógeno predominantes na região. Como existem diferentes metodologias de identificação de raças e divergências entre estes, utilizaram-se quatro procedimentos distintos desde inoculação em variedades diferenciadoras a métodos moleculares e a comparação entre estes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e Caracterização Inicial dos Isolados

Coletaram-se, nos anos de 2014 e 2015, cerca de seis amostras de plantas de tomate em 41 unidades familiares localizadas nas comunidades Serra Velha, Serra Nova e Rio Grande, Nova Friburgo, RJ. As amostras foram colhidas ao acaso, em caminhamento em zigue-zague, do ponto mais alto até o mais baixo da propriedade. Cada ponto foi georreferenciado utilizando-se GPS (Garmin) e as coordenadas medidas em UTM (Universal Transversa de Mercator) e o Datum utilizado foi o WGS 84 (World Geodetic System).

Para cada uma das 247 amostras, avaliou-se visualmente para a presença de sintomas de murcha e anotou-se o nome da cultivar. Efetuaram-se, ainda, cortes longitudinais e observação para a presença de necrose vascular e medição da extensão do tecido necrosado comparado à extensão total da planta. Em seguida, das 247 plantas, aplicou-se o protocolo padrão para isolamento de fungos: retirada asséptica de fragmentos do xilema, sanitização em álcool 70% por 30 segundos, em hipoclorito de sódio 0,1% por 60 segundos e por fim, lavagem em água destilada esterilizada (ALFENAS et al., 2007). Depositaram-se os fragmentos em placas de Petri contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) seguido de incubação em BOD por 14 dias a $25^{\circ}\text{C}\pm 1$ com 12 horas de luz. Identificaram-se os isolados por meio de observação das características das colônias e dos macroconídios, microconídios e clamidósporos com auxílio de microscópio estereoscópico e ótico (BOOTH, 1977; NELSON et al., 1983).

Visando confirmar a patogenicidade dos isolados, inocularam-se mudas de tomateiro, cultivar Perinha Água Branca suscetível às raças 1, 2 e 3 de FOL, com todos os isolados obtidos. Utilizaram-se mudas com cerca de 30 dias e com 2 a 3 pares de folhas definitivas. Retirou-se as mudas das bandejas, lavaram-se as raízes para remoção do substrato e cortaram-se as raízes a 2 cm da porção apical. Estas foram mergulhadas nas suspensões de esporos (1×10^6 micronídios mL^{-1}) por cinco minutos e, em seguida, transplantadas para tubetes contendo a mistura substrato de produção de mudas, areia e solo (1:1:1). Após o transplante, adicionaram-se 2,0 ml da suspensão de esporos ao redor do colo de cada planta. Como testemunhas, utilizaram-se plantas inoculadas apenas com água. Aos 21 dias após a inoculação, colheram-se as mudas e efetuaram-se as avaliações observando-se a presença de sintomas típicos, amarelecimento de folhas e murchas, e de descoloração vascular (Figura 1).



Figura 1. Fluxograma das atividades realizadas. Coleta do material vegetal em propriedades agrícolas em Nova Friburgo, RJ, avaliação dos sintomas através da medição da necrose vascular, processo de isolamento direto em meio de cultura e teste de patogenicidade.

Das hastes necrosadas, recuperaram-se os respectivos isolados de FOL em cultura pura e estes foram repicados para tubos de ensaio contendo BDA e armazenados em geladeira e sob óleo mineral e solo esterilizado (DHRINGA e SINCLAIR, 2000) para os testes posteriores.

E, finalmente, os isolados obtidos foram submetidos a diferentes testes para caracterização quanto à raça: inoculação em variedades diferenciadoras de raças de FOL, PCR convencional e sequenciamento gênico.

2.2 Caracterização de Isolados Empregados como Padrão para as Raças 1, 2 e 3 de FOL

Para utilização como padrões das raças 1, 2 e 3 de FOL adquiriram-se três isolados junto à Coleção de Culturas Fúngicas Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”, Instituto Biológico, SP, fornecido como sendo das raças 1, 2 e 3, respectivamente MMBF 01/96, MMBF 02/96 e MMBF 152/12.

Os isolados controle foram validados previamente em ensaio com as cultivares ‘Ponderosa’ (suscetível as raças 1, 2 e 3), ‘Caline IPA-7’ (resistente a raça 1) e ‘Floradade’ (resistente as raças 1 e 2). Para isso, estes isolados foram repicados para meio de cultura BDA e crescidos por 14 dias em incubadora tipo BOD a 25°C ±1 sob 12 horas de luz. A inoculação foi realizada em plantas com 15 dias de idade com suspensão na concentração de $1,0 \times 10^6$ microconídios mL⁻¹. O processo de inoculação foi realizado conforme relatado anteriormente. Como testemunhas foram utilizadas plantas tratadas apenas com água. A avaliação foi realizada 21 dias após a inoculação avaliando a porcentagem de infecção do sistema vascular (extensão da descoloração vascular (ED)/altura das haste (AH)) x 100 (CARVALHO, 2003). A severidade também foi avaliada utilizando a escala de Santos (1997) e Reis et al. (2004). Foram considerados resistentes plantas com ausência de sintomas externos típicos, com ausência de descoloração vascular e nota 1,0.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado com seis repetições de plantas para cada isolado/água em cada cultivar diferenciadora. As variáveis foram submetidas a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

2.3 Identificação de Raças de FOL por Inoculação em Variedades Diferenciadoras

O ensaio foi realizado em condições de casa-de-vegetação no Setor de Horticultura do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ. Utilizaram-se quatro cultivares como diferenciadoras: ‘Ponderosa’, suscetível às raças 1, 2 e 3; ‘IPA-5’, resistente à raça 1; ‘Floradade’, resistente às raças 1 e 2; *S. pennellii* ‘LA-716’, resistente às três raças (REIS e BOITEUX, 2007). Utilizou-se, ainda, a cultivar ‘Serato’, resistente às raças 1 e 2, e uma das mais utilizadas em plantios comerciais na região de Nova Friburgo, RJ. Como padrão, utilizaram-se três isolados de FOL, MMBF 01/96, raça 1, MMBF 02/96 e MMBF 152/12, ambos da raça 2, conforme teste preliminar (Item 2.2).

Para preparo dos inóculos, repicaram-se os diferentes isolados de FOL para placas de Petri contendo o meio BDA (Batata-Dextrose-Agar) que foram cultivados por 14 dias em incubadora tipo BOD, à temperatura de 25°C±1 sob 12 horas de luz. Para preparo da suspensão, lavou-se a superfície das placas com água destilada e auxílio de pincel de cerdas macias. Em seguida a suspensão foi filtrada em gaze esterilizada e ajustada para a concentração de $1,0 \times 10^7$ microconídios mL⁻¹, com auxílio de câmara de Neubaer.

Inocularam-se as plantas produzidas em bandejas contendo substrato para produção de mudas com 25 dias após o semeio e 2 a 3 pares de folhas definitivas. Na inoculação,

retiraram-se as mudas, removeu-se o substrato aderido às raízes por meio de lavagem em água corrente e, em seguida, cortou-se a porção apical (aproximadamente 2 cm) com tesoura flambada. Logo em seguida, as raízes foram imersas nas suspensões de conídios dos respectivos isolados por aproximadamente 5 minutos e transplantadas para tubetes contendo mistura de solo, areia e substrato esterilizados (na proporção de 1:1:1). Após o transplante, adicionaram-se 2,0 mL da suspensão de conídios dos respectivos isolados aos tubetes das mudas das variedades diferenciadoras. Como testemunhas, inocularam-se mudas das cinco cultivares com água esterilizada.

Observou-se o delineamento inteiramente casualizado, com oito repetições representadas por uma muda cada e 27 tratamentos, representados pelos 24 isolados a serem testados e três isolados utilizados como padrão - MMBF 01/96, MMBF 02/96 e MMBF 152/12.

Ao final de 21 dias, avaliaram-se as plantas observando-se a presença de sintomas típicos como amarelecimento e murcha das folhas. Em seguida, as plantas foram avaliadas para a presença ou não de descoloração vascular. Para tanto, efetuaram-se cortes longitudinais das hastes e mediram-se a extensão lesionada e o comprimento total das hastes em cm. Com base nestas medidas determinou-se a severidade da doença baseada na porcentagem de infecção vascular (PIV%) com base na relação: $PIV = (\text{extensão da descoloração vascular (ED)} / \text{altura das haste (AH)}) \times 100$ (CARVALHO, 2003). A cada planta, atribuíram-se, ainda, notas de 1 a 5 conforme escala descritiva de Santos (1997), onde: (1) plantas sem sintomas; (2) plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; (3) plantas com escurecimento vascular e com murcha ou amarelecimento foliar; (4) plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar e, (5) plantas mortas. Consideraram-se como virulentos às respectivas variedades aqueles isolados que resultaram em reação compatível e severidade equivalente a nota maior que 1. A média das notas foi avaliada segundo Reis et al. (2004), onde: 1,0= semelhante à imune (SI); 1,1-2,0= altamente resistente (AR); 2,1-3,0= medianamente resistente (MR); 3,1-4,0= suscetível (SU) e; 4,1-5,0= altamente suscetível (AS).

Foram também avaliadas: taxa de massa fresca da parte aérea (TXMF) [(MF plantas inoculadas/MF planta controle) - 1 x 100] e a correlação entre TXMF e PIV.

Os dados de PIV foram submetidos a testes de normalidade (Teste de Lilliefors) e de homogeneidade das variâncias (COCHRAN e BARTLETT, 1947) e, posteriormente, submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) e as médias agrupadas pelo teste de Scott-knott ($p < 0,05$) utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

2.4 Caracterização das Raças de FOL por PCR Convencional e Sequenciamento Gênico

Para a identificação da espécie e das raças de FOL por PCR, utilizaram-se culturas puras em meio líquido, extração de DNA e medição da qualidade do mesmo. Em seguida, realizou-se o sequenciamento gênico.

Para a extração do DNA genômico, culturas puras dos respectivos isolados foram crescidas em meio Batata-Dextrose-Both (BDB) sob agitação constante, temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e 12 horas de luz. Ao final de sete dias, os discos de micélio foram separados, lavados, secos e, posteriormente, transferidos para tubos eppendorf de 1,5 mL, colocados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados em freezer (-20°C) até a extração do DNA e para testes posteriores.

Extraíu-se o DNA do micélio de cada isolado com o kit *Invisorb® Spin Plant Mini* (InviteK, Berlim, Alemanha), seguido as recomendações do fabricante. Cerca de 60 mg de

micélio foi triturado em nitrogênio líquido usando agitador modelo Retsch MM300 (Alemanha) por 1 min à frequência de 20 Hz. Em seguida, adicionou-se a cada eppendorf 400 µL de *Lysis Buffer P* e 20 µL de Proteinase K que foi homogeneizado em vortex brevemente. Em seguida foi incubado a 65°C por 30 minutos sob agitação. Após essa etapa, o material foi transferido para pré-filtro e centrifugado por 1 minuto a 11000 rpm. O pré-filtro foi retirado e em seguida adicionado 20 µL de RNase A no filtrado, que foi agitado em vortex brevemente, e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Após esse tempo, foi adicionado 200 µL de *Binding buffer A* e novamente agitado em vortex.

A solução foi transferida para tubos eppendorf de 2 mL com *Spin Filter* e incubada por 1 minuto. A seguir a amostra foi centrifugada a 11000 rpm por 2 minutos. O filtrado foi descartado. Ao tubo com o *Spin filter* foi adicionado 550 µL de *Wash Buffer I* que foi centrifugado a 11000 rpm por 1 minuto. Descartado o filtrado, o *Spin filter* foi colocado novamente no eppendorf de 2 mL e adicionado 550 µL de *Wash Buffer II* com seguinte centrifugação a 11000 rpm por 1 minuto. A solução filtrada foi descartada e o processo de lavagem com *Wash Buffer II* repetido. Finalmente, foi descartado o filtrado e centrifugado por 4 minutos a 11000 rpm para remoção do etanol residual. O *Spin filter* foi passado para tubo eppendorf de 1,5 mL e adicionado 50 µL de *Elution Buffer* pré-aquecido a 65°C. Incubado por 3 minutos. Centrifugado por 1 minuto a 11000 rpm. O processo foi repetido novamente. Por fim o *Spin filter* foi descartado e o DNA extraído armazenado a -20°C.

As reações de PCR foram realizadas no aparelho “*Step One Plus Real-Time PCR System*” (“*Applied Biosystems*”). Todas as reações foram feitas em duplicata e para cada amostra foi preparado o mix de reação contendo 2 µL de DNA genômico (10 ng/µL), 5µL de PCR buffer (5 X PCR buffer), 0,5 µL de dNTPs (10mM), 1,75 µL de cada iniciador (10µM), 0,15 µL de TaqMan (5 U/µL) e 13,85 µL de água mili-Q estéril, com volume total de 25 µL. As condições para a reação seguiram recomendações do fabricante de acordo com cada par de iniciador utilizado.

Para aferir a qualidade (integridade) do DNA foi utilizado o par de iniciadores universais ITS 4 e 5 e medido a concentração de DNA extraído de cada isolado no aparelho nanodrop (ng de DNA). E para identificação e diferenciação de raças, foram utilizados “iniciadores SIX” desenhados por Van der Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009), iniciador desenhados por Hirano e Arie (2006), para as raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e iniciador específico para raça 2 desenhado por Gonçalves (2015) (Tabela 1).

Tabela 1. Sequências dos iniciadores desenhados por Lievens et al. (2009), Van der Does et al. (2008), Hirano e Arie (2006) e Gonçalves (2015) para a diferenciação das raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

Raça	Alvo	Forward Primer	Reverse Primer	Tamanho (bp)	Referências
1, 2 e 3 FOL	SIX3	5'-CCAGCCAGAAGGCCAGTTT-3'	5'-GGCAATTAACCACTCTGCC-3'	608	Van der Does et al. (2008)
1 FOL	SIX4	5'-TCAGGCTTCACTTAGCATAC-3'	5'-GCCGACCGAAAAACCTAA-3'	967	Lievens et al., (2009)
3 FOL	SIX3-G121A-F2	5'-ACGGGGTAACCCATATTGCA-3'	5'-GGCAATTAACCACTCTGCC-3'	429	Lievens et al., (2009)
3 FOL	SIX3-G134A-F2	5'-TTGCGTGTTTCCCGGCCA-3'	5'-GGCAATTAACCACTCTGCC-3'	414	Lievens et al., (2009)
3 FOL	SIX3-G137C-F1	5'-GCGTGTTTCCCGGCCGCC-3'	5'-GGCAATTAACCACTCTGCC-3'	412	Lievens et al., (2009)
1, 2, 3 FOL e FORL	Uni	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'	670 ~ 672	Hirano e Arie (2006)
1 e 3 FOL	sp13	5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3'	5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'	445	Hirano e Arie (2006)
2 e 3 FOL	sp23	5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3'	5'-GCAACAGGTCGTGGGGAAAA-3'	518	Hirano e Arie (2006)
FORL	spr1	5'-GATGGTGGAACGGTATGACC-3'	5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3'	947	Hirano e Arie (2006)
2 FOL	R2BR	5'-GGTCCTTCCAATGCTATTGTTC-3'	5'-TGGACGTGTCAGTGGATTCT-3'	-	Gonçalves (2015)

Por fim, os isolados foram caracterizados com base no sequenciamento com iniciador específico (SIX3) e comparados com sequências depositadas no banco de dados Genbank - NCBI (National Center for Biotechnology Information, website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e analisadas quanto a identidade pelo BLASTn 2.6.0 (ZHANG et al., 2000; MORGULIS et al., 2008).

2.4.1 Caracterização com conjunto de iniciadores de Van der Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009)

No primeiro “teste” foi utilizado o sistema de marcadores moleculares de Van der Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009) para a diferenciação dos isolados quanto às raças fisiológicas. A extração do DNA e as concentrações utilizadas para realização da PCR foi feito como citado anteriormente. Os iniciadores utilizados foram: SIX3, SIX4, SIX3-G121A-F2, SIX3-G134A-F2 e SIX3-G137C-F1 (Tabela 1).

Para os iniciadores SIX3 e SIX4, o programa utilizado para amplificação dos fragmentos consistiu em ciclo inicial de 2 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 59°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para alongação e ciclo final de 72°C por 10 minutos. Para os iniciadores SIX3-G121A-F2, SIX3-G134A-F2 e SIX3-G137C-F1 foi realizado o mesmo programa com exceção da temperatura de anelamento que foi de 67°C e tempo de alongação de 2 segundos e 30 ciclos.

Os produtos da PCR foram determinados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados em brometo de etídeo por 10 minutos (Tabela 2 e Tabela anexo 1).

Tabela 2. Padrão esperado na identificação de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) por reação de cadeia polimerase com iniciadores específicos de acordo com Lievens et al. (2009) e Van der Does et al. (2008).

	SIX3	SIX4	SIX3-G121A-F2*	SIX3-G134A-F2*	SIX3-G137C-F1*
FOL raça 1	+	+	-	-	-
FOL raça 2	+	-	-	-	-
FOL raça 3	+	-	+	+	+

* Amplificação de pelo menos um desses iniciadores classifica o fungo como pertencente a raça 3.

2.4.2 Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizando conjunto de iniciadores do trabalho de Hirano e Arie (2006)

No segundo “teste” foi utilizado o sistema de marcadores moleculares de Hirano e Arie (2006) para a diferenciação dos isolados quanto às raças fisiológicas. A extração de DNA e as concentrações utilizadas para realização da PCR foi feito como citado anteriormente. Os iniciadores utilizados foram: uni, sp13, sp23 e sprl. O programa para amplificação dos fragmentos consistiu de 50 ciclos de 94°C por 1 minuto para desnaturação, seguido por 62°C por 1 minuto para anelamento e 72°C por 2 minutos para alongação. Os produtos da PCR foram determinados por eletroforese em gel de agarose 2,0% e corados em brometo de etídeo por 10 minutos (Tabela 3 e Tabela anexo 1).

Tabela 3. Padrão esperado na identificação de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) por reação de cadeia polimerase com iniciadores específicos de acordo com Hirano e Arie (2006).

	uni	sp13	sp23	sp1
FOL raça 1	+	+	-	-
FOL raça 2	+	-	+	-
FOL raça 3	+	+	+	-
FORL	+	-	-	+

2.4.3 Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* utilizando iniciadores de Gonçalves (2015)

No terceiro “teste”, visando identificar os isolados pertencentes a raça 2, foi utilizado o par de iniciadores (R2BR-F e R2BR-R) desenhado por Gonçalves (2015) específico para esta raça (Tabela 1). A extração de DNA e as concentrações utilizadas para realização da PCR foi feita como citado anteriormente. O programa utilizado para a amplificação dos fragmentos foi ciclo inicial de 94°C por 4 min, seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos para a desnaturação, 55°C por 30 segundos para anelamento, e 72°C por 45 segundos para alongação, e ciclo final a 72°C por 7 min.

2.4.4 Identificação molecular por seqüenciamento do DNA dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

O seqüenciamento foi realizado nos isolados que tiveram resultado positivo para o iniciador SIX3, utilizando o produto dessa PCR. Para isso, procedeu-se a purificação da amostra utilizando o Kit Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante.

Após purificação 10 µL de cada amostra (concentração de 20 ng/µL) foi colocada individualmente em tubos de 1,5 mL e adicionados 4 µL da solução do iniciador (*forward* ou *reverse*) (concentração de 5µM), resultando em um total de 14 µL. As amostras foram seqüenciadas pelo grupo LGC Genomics, Holanda.

As amostras seqüenciadas foram analisadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5* e obtidas as seqüências consensos estas foram comparadas com sequencias disponíveis no Genbank, *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando BLASTn 2.6.0 (ZHANG et al., 2000; MORGULIS et al., 2008). As seqüências foram alinhadas utilizando o programa Mega 7 version 7.0.21 e construído a árvore filogenética baseado no método UPGMA (*Unweighted pair-group method using an arithmetic average*).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Origem dos Isolados

Identificou-se a presença de *Fusarium* sp. em 15% das 247 amostras de plantas. Obtiveram-se, ao final, 38 isolados de *Fusarium* sp., identificados com base nas características das colônias, presença e formato de conídios (macroconídios e microconídios e clamidósporos) (BOOTH, 1977; NELSON et al., 1983). Estes foram obtidos em sua maioria na comunidade de Serra Velha, 24 isolados (63,2%), seguido de Serra Nova, nove isolados (23,7%) e de Rio Grande, cinco isolados (13,1%), e das cultivares conforme Figura 2 e Tabela 4.

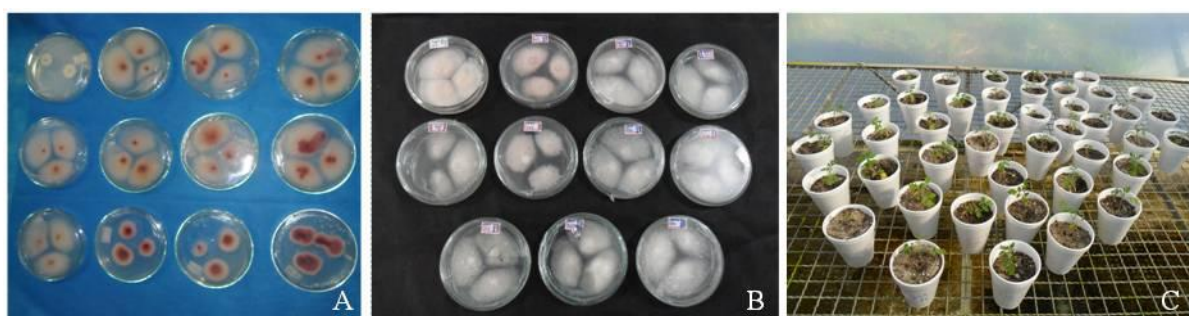


Figura 2. A e B) Placas de Petri com amostras das culturas de isolados identificados como sendo de *Fusarium* sp.; C) Detalhe do teste de patogenicidade.

Tabela 4. Identificação dos isolados e respectivas informações quanto ao local da coleta, cultivar, condição da planta quanto à intensidade da doença por ocasião da coleta, expressa pela porcentagem de infecção do sistema vascular, e resultado do teste de patogenicidade em tomateiro e espécie de *Fusarium* identificada (continua).

Identificação do isolado	Comunidade	Cultivar	Sintomas da planta (Infecção vascular %)	Virulência	Espécie
FUS 0101	Serra Velha	Lumi	Murcha (0%)	-	-
FUS 0505	Serra Velha	Serato	Assintomática (0%)	+	FOL
FUS 0602	Serra Velha	Siluet	Murcha (41,73%)	+	FOL
FUS 0604	Serra Velha	Siluet	Assintomática (0%)	-	-
FUS 0701	Serra Velha	Serato	Murcha (0%)	+	FOL
FUS 0706	Serra Velha	Serato	Assintomática (0%)	+	FOL
FUS 0802	Rio Grande	Siluet	Murcha (0%)	+	FOL
FUS 0806	Rio Grande	Siluet	Assintomática (27,17%)	-	-
FUS 0902	Rio Grande	Siluet	Murcha (21,74%)	+	FOL
FUS 0903	Rio Grande	Siluet	Murcha (52,86%)	+	FOL
FUS 1001	Rio Grande	Giuliana	Murcha (83,57%)	+	FOL
FUS 1105	Serra Velha	Serato	Assintomática (0%)	+	FOL
FUS 1202	Serra Velha	Cromo	Murcha (0%)	-	-
FUS 1203	Serra Velha	Cromo	Murcha (0%)	-	-
FUS 1301	Serra Velha	Serato	Murcha (0%)	+	FOL
FUS 1302	Serra Velha	Serato	Murcha (0%)	+	FOL
FUS 1303	Serra Velha	Serato	Murcha (0%)	+	FOL
FUS 1402	Serra Velha	Alambra	Murcha (0%)	+	FOL
FUS 1405	Serra Velha	Alambra	Assintomática (60%)	+	FOL
FUS 1406	Serra Velha	Alambra	Assintomática (0%)	+	FOL

Tabela 4. Continuação.

FUS 1701	Serra Velha	Siluet	Murcha (63,64%)	+	FOL
FUS 1703	Serra Velha	Siluet	Murcha (100%)	-	-
FUS 1705	Serra Velha	Siluet	Assintomática (0%)	+	FOL
FUS 2006	Serra Nova	Natália	Assintomática (0%)	-	-
FUS 2401	Serra Nova	Serato	Murcha (29,27%)	-	-
FUS 2703	Serra Nova	Alambra	Murcha (61,54)	+	FOL
FUS 2804	Serra Nova	Serato	Assintomática (50%)	-	-
FUS 2903	Serra Nova	Serato	Murcha (59,70%)	+	FOL
FUS 2906	Serra Nova	Serato	Assintomática (9,52%)	+	FOL
FUS 3102	Serra Nova	Juliet	Murcha (66,67%)	+	FOL
FUS 3103	Serra Nova	Juliet	Murcha (42,86%)	+	FOL
FUS 3302	Serra Nova	Serato	Murcha (45,45%)	+	FOL
FUS 0107	Serra Velha	Serato	Murcha	-	-
FUS 0108	Serra Velha	Serato	Murcha	-	-
FUS 0407	Serra Velha	Serato	Murcha	-	-
FUS 3	Serra Velha	Serato	Murcha	-	-
FUS 5	Serra Velha	Serato	Murcha	+	FOL
FUS 7	Serra Velha	Serato	Murcha	-	-

De acordo com Gao e Zang (2013), a diferenciação de isolados de *Fusarium oxysporum* dentro de formas especializadas ou entre raças fisiológicas não é possível somente com base na análise morfológica, portanto testes fisiológicos, bioquímicos e patológicos devem ser realizados de formas adicionais para uma correta identificação.

Dos 38 isolados originalmente obtidos, 24 (63,2%) foram identificados como sendo FOL e caracterizados como virulentos ao tomateiro. Estes 24 isolados (Tabela 4) causaram sintomas típicos de murcha-de-fusário nas plantas de tomateiro, cultivar ‘Perinha Água Branca’ como amarelecimento, seca e murcha das folhas e descoloração do sistema vascular que se iniciam pelas folhas basais. Outros 14 (36,8%) isolados FUS 2006, FUS 2401, FUS 3 e FUS 7 também foram patogênicos mas causaram sintomas distintos como amarelecimento de folhas, podridão de colo e raiz, subdesenvolvimento generalizado e morte das mudas em até duas semanas desde a inoculação. Estes isolados foram preservados para estudos futuros e não foram utilizados no presente trabalho. Os demais isolados, FUS 0101, FUS 0604, FUS 0806, FUS 1202, FUS 1203, FUS 1703, FUS 2804, FUS 0407, FUS 0107 e FUS 0108 não foram patogênicos ao tomateiro, mas foram também preservados (Tabela 4). Segundo Boix-Ruiz et al. (2015), em plantas inoculadas a expressão dos sintomas da doença nem sempre ocorre, pois fatores com perda de patogenicidade do patógeno e temperatura podem interferir no resultados, contudo mesmo com a ausência de sintoma é possível o reisolamento do patógeno.

Os isolados FUS 3102 e FUS 3103, identificados como FOL foram obtidos da cultivar Juliet (*Johnny’s seeds*), sem referência da empresa quanto à resistência a esta doença. O isolado FUS 1001 foi obtido da cultivar Giuliana (Sakata) referida pela empresa como sendo resistente à raça 1 do patógeno; os isolados FUS 0505, FUS 0602, FUS 0701, FUS 0706, FUS 0802, FUS 0902, FUS 0903, FUS 1001, FUS 1105, FUS 1301, FUS 1302, FUS 1303, FUS 1402, FUS 1405, FUS 1406, FUS 1701 FUS 1705, FUS 2703, FUS 2903, FUS 2906, FUS 3102, FUS 3103, FUS 3302 e FUS 5 foram obtidos das cultivares Lumi (Sakata), Siluet (Syngenta), Serato (Topseed) e Alambra (Clause), referidas pelas respectivas empresas como sendo resistentes às raças 1 e 2 de FOL. Como a maioria das cultivares são informadas como sendo resistentes às raças 1 e 2 de FOL, levantam-se duas possibilidades: presença e ampla distribuição da raça 3 de FOL na região ou, a resistência informada pelas respectivas empresas é apenas parcial. Reis et al. (2005) e Reis e Boiteux (2007), obtiveram isolados de

FOL da cultivar Alambra e outras em lavouras comerciais no Espírito Santo e no Rio de Janeiro e os identificaram como sendo da raça 3.

Finalizada a caracterização inicial, os isolados de FOL foram submetidos a uma série de testes em cultivares diferenciadoras para identificação das raças e a testes moleculares para confirmação da espécie vista ser a caracterização morfológica sujeita a erros pelas similaridades entre espécies de *Fusarium* (STEENKAMP et al., 2000).

3.2 Caracterização de Isolados para Padrão de Raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Observou-se reação compatível entre cultivar Ponderosa e os três isolados de FOL testados com 100% de infecção do sistema vascular pelos isolados MMBF 01/96 e MMBF 152/12 e 30% pelo isolado MMBF 02/96. As variedades Caline IPA-7 (resistentes à raça 1) e Floradade (resistente às raças 1 e 2) apresentaram reação incompatível com o isolado MMBF 01/96, 0,0% de infecção. Este resultado permite identificar este isolado como sendo da raça 1 de FOL (Tabela 5 e Figura 3). A variedade Caline IPA-7 apresentou reação compatível com os isolados MMBF 02/96 e MMBF 152/12, com 35% e 63% de infecção do sistema vascular, respectivamente, e a variedade Floradade apresentou reação incompatível com estes dois isolados, 0% de infecção do xilema. Este resultado permitiu identificá-los como sendo da raça 2 de FOL (Tabela 5, Figura 3A e Figura 3B).

Tabela 5. Reação de série de variedades diferenciadoras de tomateiro a três isolados de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Variedade diferenciadora	Resistência	Isolado		
		MMBF 01/96	MMBF 02/96	MMBF 152/12
Ponderosa	S	+	+	+
Caline IPA-7	R1	-	+	+
Floradade	R1 e R2	-	-	-
Raça identificada		1	2	2

+ Reação compatível ou de suscetibilidade; - Reação incompatível ou de resistência.

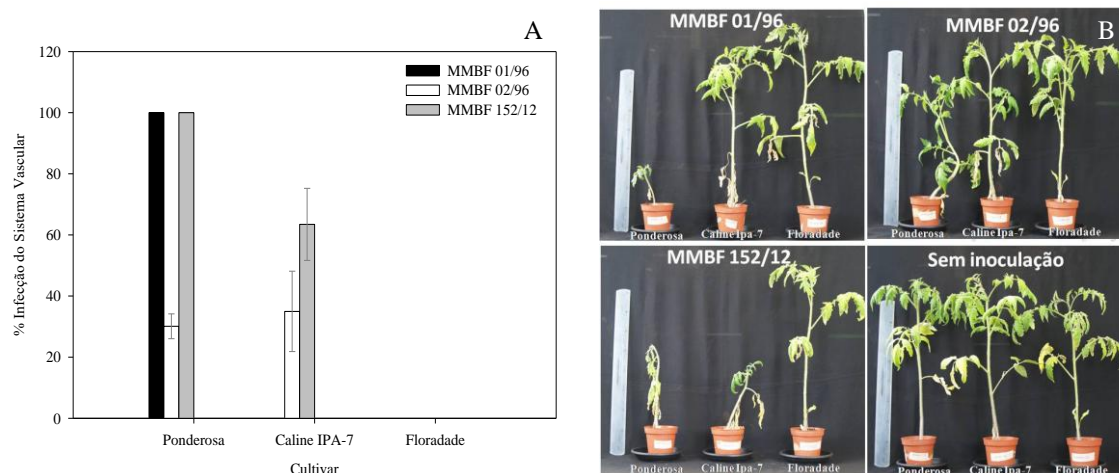


Figura 3. Porcentagem de infecção do sistema vascular de plantas das variedades Ponderosa, Caline IPA-7 e Floradade inoculadas com os isolados MMBF 01/96, MMBF 02/96 e MMBF 151/12 de FOL (A) e reação das respectivas diferenciadoras a estes três isolados (B).

3.3 Caracterização dos Isolados Quanto à Raça Fisiológica

3.3.1 Cultivares diferenciadoras

Os 24 isolados identificados como sendo de FOL apresentaram reação compatível com cultivar Ponderosa, suscetível às três raças do patógeno, com IPA5, resistente à raça 1; com Floradade, resistente às raças 1 e 2; com ‘Serato’, resistente às raças 1 e 2, e, incompatível com *Solanum pennellii* LA-716, resistentes às raças 1, 2 e 3 de FOL (Tabela 6 e Figura 4).

Tabela 6. Efeito do isolado sobre a porcentagem de infecção vascular (PIV) da série de cultivares diferenciadoras de raças de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Isolados	Reação e Porcentagem de Infecção Vascular (%)					Raça identificada
	Ponderosa	IPA 5	Floradade	Serato	LA-716	
	S	R1	R1 e R2	R1 e R2	R1, R2 e R3	
MMBF01/96* - R1	+ 100,0 a	- 0,0 d	- 0,0 c	- 0,0 d	- 0,0 a	1
MMBF02/96* - R2	+ 85,4 a	+ 65,7 b	- 0,0 c	- 0,0 d	- 0,0 a	2
MMBF152/12* - R2	+ 85,7 a	+ 100,0 a	- 0,0 c	+ 7,0 d	- 0,0 a	2
FUS 0505	+ 100,0 a	+ 100,0 a	+ 97,6 a	+ 92,0 a	- 0,0 a	3
FUS 0602	+ 92,7 a	+ 75,0 b	+ 45,0 a	+ 43,2 b	- 0,0 a	3
FUS 0701	+ 100,0 a	+ 78,2 b	+ 46,4 a	+ 87,1 a	- 0,0 a	3
FUS 0706	+ 100,0 a	+ 100,0 a	+ 83,4 a	+ 86,2 a	- 0,0 a	3
FUS 0802	+ 93,0 a	+ 92,5 a	+ 35,2 a	+ 94,0 a	- 0,0 a	3
FUS 0902	+ 100,0 a	+ 95,5 a	+ 77,5 a	+ 50,5 b	- 0,0 a	3
FUS 0903	+ 100,0 a	+ 100,0 a	+ 88,3 a	+ 100,0 a	- 0,0 a	3
FUS 1001	+ 100,0 a	+ 100,0 a	+ 100,0 a	+ 83,0 a	- 0,0 a	3
FUS 1105	+ 74,7 b	+ 90,6 a	+ 100,0 a	+ 85,8 a	- 0,0 a	3
FUS 1301	+ 84,8 a	+ 100,0 a	+ 75,1 a	+ 85,9 a	- 0,0 a	3
FUS 1302	+ 91,5 a	+ 48,7 c	+ 84,7 a	+ 93,2 a	- 0,0 a	3
FUS 1303	+ 99,8 a	+ 90,6 a	+ 77,3 a	+ 62,5 b	- 0,0 a	3
FUS 1402	+ 97,0 a	+ 88,4 a	+ 23,8 b	+ 78,8 a	- 0,0 a	3
FUS 1405	+ 90,7 a	+ 86,3 a	+ 79,3 a	+ 71,3 a	- 0,0 a	3
FUS 1406	+ 99,3 a	+ 100,0 a	+ 100,0 a	+ 100,0 a	- 0,0 a	3
FUS 1701	+ 94,3 a	+ 27,7 c	+ 9,2 b	+ 20,2 c	- 0,0 a	3
FUS 1705	+ 96,1 a	+ 97,9 a	+ 64,9 a	+ 72,4 a	- 0,0 a	3
FUS 2703	+ 94,0 a	+ 100,0 a	+ 72,4 a	+ 94,6 a	- 0,0 a	3
FUS 2903	+ 100,0 a	+ 100,0 a	+ 92,7 a	+ 83,8 a	- 0,0 a	3
FUS 2906	+ 98,8 a	+ 94,6 a	+ 84,6 a	+ 77,6 a	- 0,0 a	3
FUS 3102	+ 66,3 b	+ 100,0 a	+ 85,6 a	+ 87,8 a	- 0,0 a	3
FUS 3103	+ 100,0 a	+ 75,0 b	+ 75,0 a	+ 78,5 a	- 0,0 a	3
FUS 3302	+ 87,5 a	+ 97,9 a	+ 81,1 a	+ 97,8 a	- 0,0 a	3
FUS 5**	+ 68,5 b	+ 86,9 a	+ 74,6 a	+ 58,8 b	- 0,0 a	3
Média	92,9	88,5	73,1	78,5	0,0	
Testemunha	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
CV(%)			19,9%			

*Isolados usados como padrão das raças 1 e 2 de FOL – R1 e R2. + Reação compatível, suscetibilidade; - Reação incompatível, imunidade.

**Coletado em Nova Friburgo, RJ, em épocas diferentes dos demais isolados.

Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha, não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$ %).

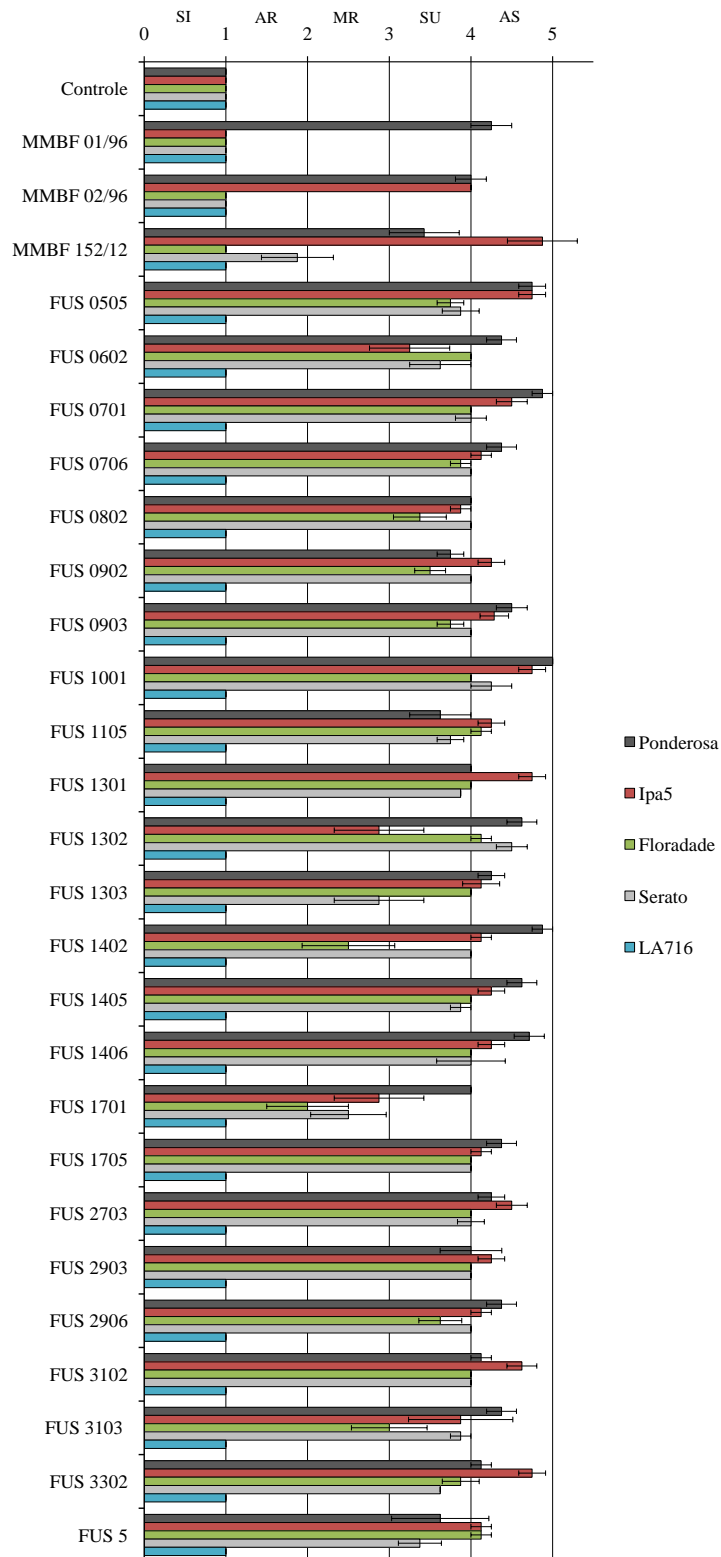


Figura 4. Reação da série de cultivares diferenciadoras aos 27 isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, expresso pela nota com base em escala de Santos (1997) e resultado das médias das notas avaliadas segundo Reis et al. (2004).

Os respectivos isolados infectaram de forma eficiente o sistema vascular das quatro cultivares, Ponderosa, IPA-5, Floradade e Serato, que resultaram em sintomas característicos

da murcha-de-fusário como amarelecimento e murcha das folhas e necrose vascular. Nenhum sintoma, ou indício de infecção vascular, foi observado nas plantas do acesso LA-716 de *S. pennellii*, utilizado como padrão resistente às raças 1, 2 e 3, quando inoculadas com os respectivos isolados testados (Tabela 6). Tendo como base a avaliação com a escala de Santos (1997), assim como trabalho de Reis et al. (2006), que considera como compatíveis reações que resultam em notas acima de 2,0, constata-se também que todos os 24 isolados obtidos na Região Serrana foram virulentos às cultivares diferenciadoras Ponderosa, IPA-5 e Floradade e avirulentos à LA-716 (Figura 4). Estes resultados apontam para o predomínio da raça 3 de FOL na região estudada, conforme já indicado pelo levantamento e análise inicial quando se constatou a doença em cultivares informadas como resistentes às raças 1 e 2. Primeiro registro da raça 3 no Brasil foi realizado por Reis et al. (2005) no Espírito Santo e há cerca de dez anos a raça 3 foi relatada em plantios comerciais de tomate nos municípios de São José de Uba e Itaocara, Estado do Rio de Janeiro por REIS e BOITEUX (2007). A presença da raça 3 em Nova Friburgo, RJ, demonstra a sua disseminação entre as lavouras do Estado, fato preocupante diante dos prejuízos que o patógeno causa à cultura e das limitadas formas efetivas de controle quando esse já se encontra estabelecido na área.

Apesar da não diferença entre os isolados quanto à raça, os mesmos variam quanto à virulência com destaque para FUS 1701, como o menos virulento (I médio <40% e nota <3, exceto em Ponderosa) e FUS 0505, FUS 0706, FUS 0903, FUS 1001, FUS 1406, FUS 2903 e FUS 3302 como os mais virulentos (I médio >80% e nota >3,0) (Tabela 6 e Figura 4) e o seu efeito sobre o acúmulo de massa fresca pelas plantas, avaliado pela perda de massa fresca (PMF). De forma geral, plantas das cinco variedades apresentaram redução no acúmulo de massa quando inoculadas com a maioria dos isolados. Esta redução foi mínima em LA-716 (PM<20% e em >50% dos isolados), seguido de Floradade (PM<40% e em cerca de 96,3% dos isolados), de Serato (PM<60% e em 85,2 % dos isolados, exceto MMBF 152/12, FUS 0902 e FUS 5, com aumento de 10 a 20% e FUS 1405 sem relevante aumento 0,93%). Huang e Lindhout (1997), também observaram em cultivares resistentes menor redução do crescimento do que em cultivares suscetíveis.

A redução média na massa fresca acumulada em Ponderosa (>30%) ocorreu em mudas inoculadas com quase todos os isolados, exceto com FUS 0902, FUS 1105 e FUS 1301 (ganho de massa >32% >17% e >6,5%, respectivamente). A cultivar IPA 5 sofreu redução da massa fresca quando inoculadas com todos os isolados ao qual foi inoculado, porém baixa (<12%) em MMBF 01/96, MMBF 02/96, FUS 0505, FUS 1302, FUS 1701 e FUS 0802 (Figura 5).

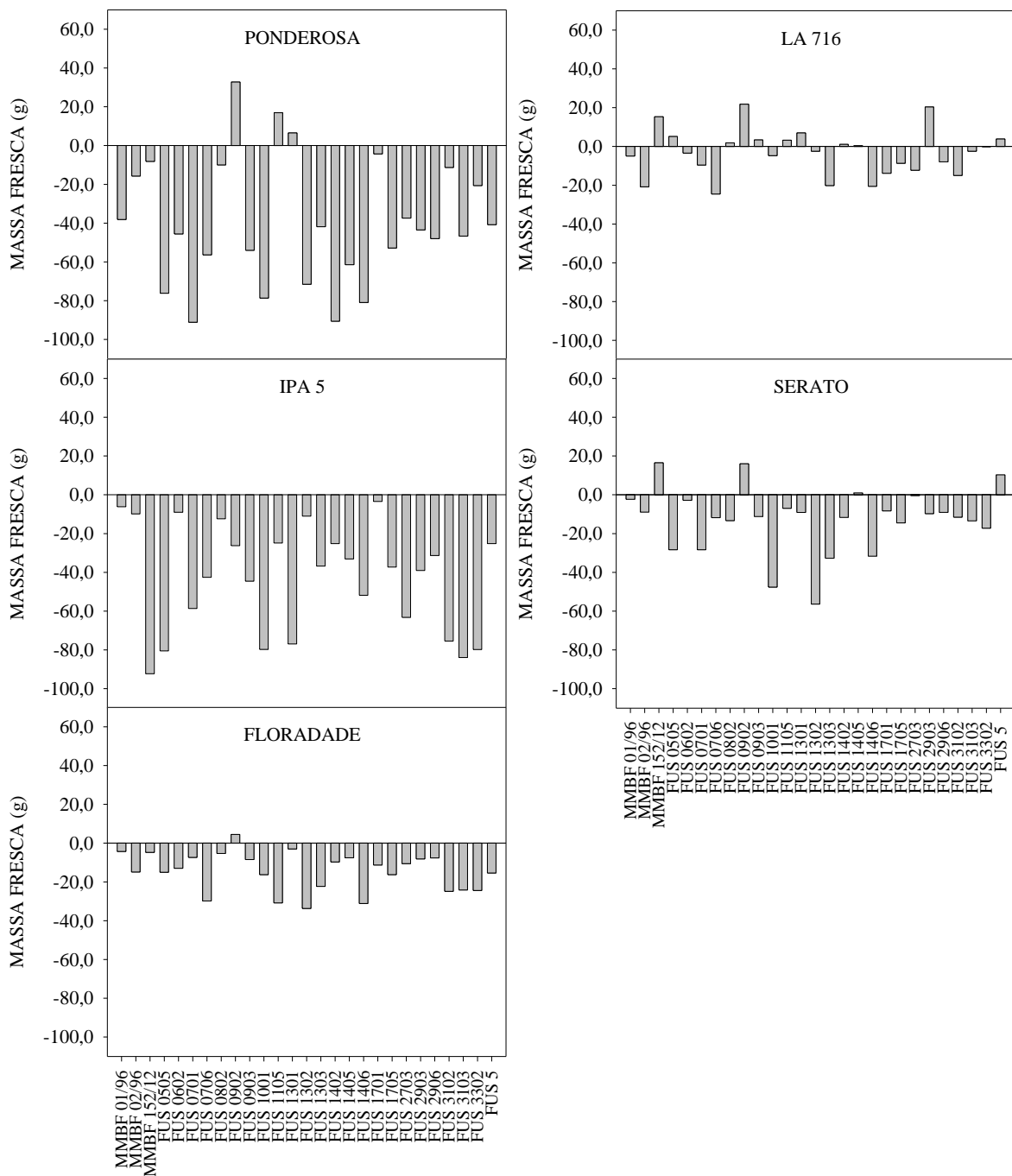


Figura 5. Perda de massa fresca (PMF) das cultivares diferenciadoras de raças fisiológicas e da cultivar Serato, inoculadas com diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em relação ao controle.

A maioria dos isolados reduziram o acúmulo de massa fresca das mudas, porém uma menor parte favoreceu o acúmulo de massa como FUS 0902 que estimulou o crescimento nas cultivares Ponderosa, Floradade, LA-716 e Serato. Este forte efeito do patógeno no desenvolvimento das plantas tem relação com a infecção dos feixes vasculares (HUANG e LINDHOUT, 1997) ao qual é bloqueado impedindo a passagem de água resultando na murcha da planta (MICHELSE e REP, 2009).

Esta relação entre a massa fresca da parte aérea (TXMF) com infecção vascular (PIV) e Notas pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Correlação entre a taxa de massa fresca da parte aérea (TXMF) e porcentagem de infecção vascular (PIV) e escala de notas (Notas).

	Cultivar	Infecção vascular %		Notas	
		r	p	r	p
TXMF	Ponderosa	-0,456	0,017**	-0,863	0,000**
	IPA-5	-0,567	0,002**	-0,680	0,000**
	Floradade	-0,428	0,026**	-0,328	0,095
	Serato	-0,464	0,015**	-0,346	0,077

Cultivar ‘LA-716’ não foi apresentada na tabela devido à ausência da doença. **Correlação significativa a $p < 0,05$. r= coeficiente de correlação.

A TXMF teve correlação negativa e significativa ($p < 0,05\%$) com a PIV nas cultivares Ponderosa, IPA-5, Floradade e Serato. Ou seja, quanto maior o nível de colonização do patógeno na planta, menor peso da planta e, portanto maiores perdas de massa fresca (PMF). O mesmo para a correlação entre TXMF e Notas nas cultivares Ponderosa e IPA-5, onde o crescimento das notas, aumento da expressão dos sintomas da doença, representou redução na massa fresca. Correlação negativa entre índice de avaliação da murcha-de-fusário (notas) e peso fresco em tomateiro também foi observado em trabalho de Jelinsk et al. (2017). Perdas de massa fresca são comumente utilizadas como avaliação em teste de patogenicidade e para discriminação de raças de FOL (LIEVENS et al., 2009; JELINSK et al., 2017), contudo essa deve ser usada como complementar a outros métodos para correta aferição da doença. Segundo BOIX-RUIZ et al. (2015), a avaliação da murcha-de-fusário em plantas não deve se ser limitada somente a sintomas externos, sendo importante também observar a infecção vascular assim como a recuperação do patógeno em isolamentos a partir do xilema.

3.3.2 Diferenciação de raças por qPCR Convencional

Além da identificação das raças dos isolados utilizando-se a série de cultivares diferenciadoras, efetuou-se a caracterização dos mesmos com o conjunto de iniciadores desenhados por Van der Does et al. (2008), Lievens et al. (2009), por Hirano e Arie (2006), Gonçalves (2015) e por seqüenciamento do DNA. Para tanto foram selecionados apenas os isolados identificados como virulentos ao tomateiro e que causaram sintomas típicos de murcha-de-fusário e já caracterizados quanto à raça utilizando-se a série de diferenciadoras.

A qualidade do DNA extraído do micélio dos 21 isolados foi confirmada utilizando os iniciadores universais ITS 4 e 5. Segundo White et al. (1990), iniciadores ITS4 e ITS5 anelam com regiões conservadas 18S e 28S respectivamente dos genes RNAr, o que testa a qualidade do DNA. Dessa forma, a combinação desse conjunto de iniciadores e da medição da concentração de DNA no aparelho nanodrop permitiu verificar que as amostras apresentaram boa qualidade para serem usadas nos estudos moleculares.

3.3.2.1 Caracterização molecular dos isolados de FOL com o conjunto de iniciadores de Van de Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009)

Os genes que codificam as proteínas Six (*SIX1* a *SIX7*), são conhecidos por estarem presentes nas *formae speciales* de *Fusarium oxysporum*, sendo que *SIX1* a *SIX5* são as

encontradas na forma patogênica *lycopersici* e por isso, utilizados na sua identificação. As proteínas SX6 e SIX7 estão presentes em outras formas *speciales* como *melonis*, *radiciscucumerinum* (SIX6) e *lilii* (SIX7) (LIEVENS et al., 2009).

O gene SIX3 (*Avr2*) está presente em todos isolados FOL, raças 1, 2 e 3, capazes de causar murcha-de-fusário em tomateiro (VAN DER DOES et al., 2008) e a existência de polimorfismo nesse gene permite a diferenciação entre as raças 2 e 3. O gene SIX4 (*Avr1*) é caracterizado por estar presente somente em isolados da raça 1 de FOL (HOUTERMAN et al., 2009; LIEVENS et al., 2009).

O iniciador SIX3, amplificou para todos os isolados testados com exceção dos isolados FUS 0602, FUS 1001 e FUS 1701, previamente caracterizados como sonda da raça 3 pelo teste nas variedades diferenciadoras (Figura 4, Tabela 8 e Figura anexo 1).

Tabela 8. Identificação dos isolados de *Fusarium oxysporum* f sp. *lycopersici* (FOL). Raça identificada com base em inoculação em variedades diferenciadoras, por PCR utilizando o conjunto de iniciadores de Van de Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009) e de Hirano e Arie (2006) e comparação com sequências depositadas no Genbank- NCBI.

Isolados de FOL	Variedades Diferenciadoras Raça	Conjunto de iniciadores de Van der Does et al., (2008) e Lievens et al., (2009)				Conjunto de iniciadores de Hirano e Arie (2006)				Genbank (NCBI) Raça	
		SIX3	SIX4	SIX3-G121A	Raça	uni	sp13	sp23	spr		Raça
MMBF01/96	1	+	+	-	1	+	+	-	-	1	1
MMBF02/96	2	+	+	-	1	+	+	-	-	1	1
MMBF152/12	2	+	+	-	1	+	+	-	-	1	1
FUS 0505	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 0602	3	-	+	+	NI	+	+	+	-	3	3
FUS 0701	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 0706	3	+	-	-	2	+	+	+	-	3	3
FUS 0802	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 0902	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FUS 0903	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 1001	3	-	-	+	NI	+	+	+	-	3	3
FUS 1105	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FUS 1301	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FUS 1302	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 1303	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 1402	3	+	-	+	3	+	+	+	-	3	3
FUS 1405	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 1406	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 1701	3	-	-	-	NI	-	-	+	-	NI	3
FUS 1705	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 2703	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FUS 2903	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 2906	3	+	-	+	3	+	+	+	-	3	3
FUS 3102	3	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 3103	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
FUS 3302	3	+	-	-	2	+	+	+	-	3	3
FUS 5	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*NA- Não avaliados por PCR e sequenciamento gênico; NI – Não identificado.

+ amplificação presente; - amplificação ausente.

Em relação ao iniciador SIX4, que caracteriza isolados pertencentes à raça 1, observaram-se algumas amplificações que variaram, porém, quanto à intensidade. Amplificações com pouca intensidade foram obtidas por: FUS 0505, FUS 0602, FUS 0701, FUS 0802, FUS 0903, FUS 1302, FUS 1303, FUS 1405, FUS 1406, FUS 1705, FUS 2903, FUS 3102 e MMBF152/12. Amplificações com forte intensidade foram observadas para os isolados: MMBF 01/96 (raça 1) e MMBF 02/96 (raça 2). Esta forte amplificação para o

isolado MMBF 01/96 está de acordo com o padrão esperado por se tratar de isolado controle raça 1, confirmado em teste de inoculação nas variedades diferenciadoras (Tabela 8 e Figura anexo 1). Esta amplificação, porém, foi atípica para o isolado MMBF 02/96 visto ter sido este previamente caracterizado como sendo da raça 2 no teste com as diferenciadoras (Tabela 6). Para a maioria dos demais isolados, FUS 0505, FUS 0602, FUS 0701, FUS 0706, FUS 0802, FUS 0903, FUS 1001, FUS 13002, FUS 1303, FUS 1405, FUS 1406, FUS 1705, FUS 2903, FUS 3102 e FUS 3302, este resultado também é divergente do padrão esperado para isolados da raça 3, conforme a caracterização prévia destes no teste em variedades diferenciadoras (Figura 4 e Tabela 8).

Para o conjunto de iniciadores utilizados na caracterização da raça 3, apenas SIX3-G121A-F2 apresentou amplificação para alguns isolados (FUS 0505, FUS 0602, FUS 0701, FUS 0802, FUS 0903, FUS 1001, FUS 1302, FUS 1303, FUS 1402, FUS 1405, FUS 1406, FUS 1705, FUS 2903, FUS 2906 e FUS 3102) os demais SIX3-134A-F2 e SIX3-G137C-F1 não apresentaram por isso não foram apresentados (Tabela 8). Todos esses isolados citados foram caracterizados por teste de patogenicidade em cultivares como pertencentes à raça 3. Devido aos diferentes padrões de amplificação, principalmente para o iniciador SIX4, este conjunto de iniciadores não permitiu uma clara diferenciação dos isolados de FOL estudados quanto à raça.

Gonçalves (2015) cita duas hipóteses para o resultado encontrado: 1) pode estar relacionada a misturas de mais de uma raça ou de isolados em alguma etapa do processo, dessa forma sugere a repetição do teste com o uso de culturas monospóricas; 2) a composição genética dos isolados brasileiros que pode ser diferente da de isolados usados na validação do conjunto de iniciadores de Van de Does et al. (2008) e de Lievens et al. (2009). No trabalho de Lievens et al. (2009), dos 75 isolados de FOL utilizados em seu estudo, nenhum era brasileiro.

Trabalho com caracterização de isolados de FOL originários de diferentes regiões do Brasil foi realizado por Gonçalves (2015) utilizando o conjunto de iniciadores correspondentes aos genes *SIX1* a *SIX7*, e assim como no presente trabalho, não conseguiu uma diferenciação dos isolados a nível de raça. Estes autores também realizaram uma análise com 520 iniciadores RAPD e verificaram um baixo nível de polimorfismo entre os isolados brasileiros, raças 1 e 2, revelando uma estreita similaridade genética, o que pode explicar o padrão de amplificação similar para essas duas raças em alguns isolados. BOIX-RUIZ et al. (2015) também fizeram uso de genes *SIX* para detecção e diferenciação de raças de FOL e seus resultados foram variáveis ou divergentes em relação ao teste de patogenicidade em cultivares.

3.3.2.2 Caracterização molecular dos isolados de FOL com o conjunto de iniciadores de Hirano e Arie (2006)

Tendo em vista os resultados divergentes entre a identificação das raças com as variedades diferenciadoras e o método com o conjunto de iniciadores de Lievens et al. (2009) e Van der Does et al. (2008), utilizou-se também o conjunto de iniciadores desenvolvido por Hirano e Arie (2006), que obtiveram resultados positivos na identificação das raças 1, 2 e 3 de FOL, obtidos de culturas puras e de amostras retiradas do tecido vegetal de tomate infectado. Usualmente, a planta é infectada por uma única raça patogênica.

Para o marcador uni, quase todos isolados amplificaram, com exceção do isolado FUS 1701, que também não amplificou no sistema de marcadores testado anteriormente. Ausência de amplificação para esse iniciador em alguns isolados também é citada por Baysal et al. (2009) que optaram por utilizar PFO2-03 para identificação da espécie ao invés do uni.

Os isolados controle MMBF 01/96 (raças 1) e MMBF 02/96 e MMBF 152/122 (raça 2) obtiveram amplificação positiva para o iniciador sp13 e negativa para sp23 e spr. Este padrão de amplificação é específico para a raça 1 de FOL. Contudo, isolados da raça 2 devidamente caracterizados com variedades diferenciadoras também apresentaram este resultado. Este fato indica que o sistema de marcadores moleculares desenvolvido por Hirano e Arie (2006) não se adequa para a diferenciação das raças 1 e 2 de FOL coletados em Nova Friburgo, RJ. Talvez esses isolados apresentem um perfil genético diferente dos de isolados utilizados para desenho destes iniciadores, que são oriundos do Japão.

Resultado similar foi encontrado em trabalho de Gonçalves (2015) ao qual relata que esses iniciadores não foram efetivos para distinção das raças 1 e 2. O autor levanta duas hipóteses para o insucesso: a primeira parte do princípio de que os isolados brasileiros de FOL são derivados de mutações em isolados da raça 1 – hipótese sustentada pelo fato de os iniciadores propostos por Hirano e Arie (2006) resultarem em mesmo padrão de amplificação para todos os isolados destas duas raças; a segunda hipótese leva em consideração que a mutação sofrida pela raça 1 dando origem a raça 2 afetou o nível de virulência sendo esta raça mais agressiva que a raça que lhe deu origem (TOKESHI e GALLI, 1966).

Segundo Kawabe et al. (2005) as raças de FOL foram introduzidas de forma independente no Japão apresentando uma maior diversidade entre as raças 1, 2 e 3, o que pode explicar a possível identificação de raças com esse conjunto de iniciadores. Segundo Hirano e Arie (2006), o uso desses iniciadores só não é efetivo para discriminar isolados de FOL provenientes de solo, já que nessas amostras pode haver uma mistura de raças.

Os demais isolados foram positivos para os marcadores uni, sp13 e sp23, caracterizando esses isolados como pertencentes à raça 3. Dessa forma, esses iniciadores foram eficientes somente para diferenciação das raças 1 e 2 da raça 3. Trabalho nesse sentido foi realizado por Barboza et al. (2013) utilizando esse conjunto de iniciadores de Hirano e Arie (2006) e identificaram a presença da raça 3 de FOL no Estado da Bahia. Com o objetivo de identificar FOL e as raças do patógeno em tomateiro na Turquia, Baysal et al. (2009) também utilizaram esse conjunto de iniciadores e identificaram com sucesso as raças 2 e 3.

Apesar do resultado encontrado nesse trabalho alguns pesquisadores tiveram resultados positivos para a diferenciação de isolados das três raças de FOL usando o conjunto de iniciadores criados por Hirano e Arie (2006), como o trabalho de Çolak e Biçici (2013) ao qual fizeram a identificação de 87 isolados originados da Turquia quanto ao gênero e raças fisiológicas 1, 2 e 3.

3.3.2.3 Caracterização de isolados de FOL utilizando iniciadores do trabalho de Gonçalves (2015)

Foi utilizado o sistema marcador SCAR OP-Z4 de Gonçalves (2015) para a discriminação da raça 2. Contudo esse não apresentou resposta positiva para os isolados controle raça 2 (MMBF 02/96 e MMBF 152/12) (dados não mostrados). Gonçalves (2015) relatou em seu trabalho que esse marcador em sua maioria permitiu diferir raça 2 de raça 1 e 3 de FOL e de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (FORL) mas, que não foi eficiente para identificar todos os isolados raça 2 devido à ausência de amplificação em alguns deles.

Apesar do resultado negativo com os isolados brasileiros de FOL no presente trabalho com o uso de alguns conjuntos de iniciadores citados na literatura (HIRANO e ARIE 2006; LIEVENS et al., 2009 e GONGALVES, 2015), o uso de métodos moleculares para identificação de FOL e discriminação de suas três raças vem se tornando cada vez mais comum devido à rapidez na resposta quando comparado ao uso de variedades resistentes e suscetíveis. Exemplos para os trabalhos citados e outros como o de Inami et al. (2010), que

utilizaram iniciadores baseados em genes de avirulência e no DNA ribossomal aos quais foram capazes de diferir FOL e suas raças a partir do patógeno originado do solo e de crescimento micelial em cultura pura. Contudo, neste trabalho o uso de cultivares diferenciadoras conjuntamente a técnica molecular permitiu um melhor entendimento e confiabilidade dos resultados.

3.3.3 Identificação molecular baseada no seqüenciamento do DNA dos isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Diante das variações nos resultados encontrados com o uso dos iniciadores específicos para identificação das raças de FOL, realizou-se o seqüenciamento do DNA dos isolados. Essas seqüências foram comparadas no Genbank (NCBI) com outras sequencias de FOL disponíveis e caracterizados quanto a raças fisiológicas 1, 2 e 3.

Com os resultados obtidos foi possível confirmar que os isolados obtidos em Nova Friburgo são pertencentes a raça 3 apresentando identidade de 100% na seqüência de DNA com outros isolados da mesma raça como é o caso de FOL-MM10 e SIX3MN25 caracterizado por Lievens et al. (2009) e Jelinski et al. (2017), respectivamente. Os isolados utilizados como padrões para as raça 1 e 2 apresentaram similaridade na seqüência de DNA de 100% com o isolado raça 1 BFOL-51 (LIEVENS et al., 2009), não sendo possível a diferenciação entre as raças 1 e 2 com o seqüenciamento do gene SIX3, por possuírem idênticas seqüências. A distinção dos isolados de raça 3 em relação às demais foi possível devido a presença de poucos pontos de mutação no gene SIX3 nesta raça (LIEVENS et al., 2009) (Tabela 9).

Tabela 9. Alinhamento de parte da seqüência do gene *SIX 3* encontrado em isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Isolados	Sequências Alinhadas	Raças	Id.	Identificação/Nome do isolado
MMBF 01/96	-GTAACCCATATTGCGTGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	1	100%	GQ268950.1 (BFOL-51)
MMBF 02/96	-GTAACCCATATTGCGTGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	2		
MMBF 152/12	-GTAACCCATATTGCGTGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	2		
BFOL-51*	-GTAACCCATATTGCGTGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	1 e 2		
FUS 0505	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 0602	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 0701	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 0706	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 0802	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 0903	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 1001	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 1302	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3	100%	GQ268957.1 (FOL-MM10) e KM047030 (SIX3MN25)
FUS 1303	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 1402	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 1405	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 1406	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 1701	GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT	3		
FUS 1705	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 2903	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 2906	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 3102	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FUS 3302	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
FOL-MM10*	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		
SIX3MN25*	-GTAACCCATATTGCA ^T TGTITCCCGGCCGCCGCACGT-	3		

*Isolados de FOL identificados quanto a raça e disponíveis no Genbank (NCBI). A presença de nucleotídeo diferente na seqüência está marcada em negrito

A análise filogenética de 26 isolados baseada na sequência SIX3 permitiu identificar quatro grupos. O grupo 1 compreendeu a maior parte dos isolados de FOL identificados como raça 3 - FUS 0505, FUS 0602, FUS 0701, FUS 0706, FUS 0802, FUS 0903 FUS 1001, FUS 1302, FUS 1303, FUS 1402, FUS 1405, FUS 1406, FUS 1701, FUS 1705, FUS 2903, FUS 2906, FUS 3102 e FUS 3302 - aos quais estão associados aos isolados FOL-MM10 e SIX3MN25 ambos raça 3 de FOL (Figura 6).

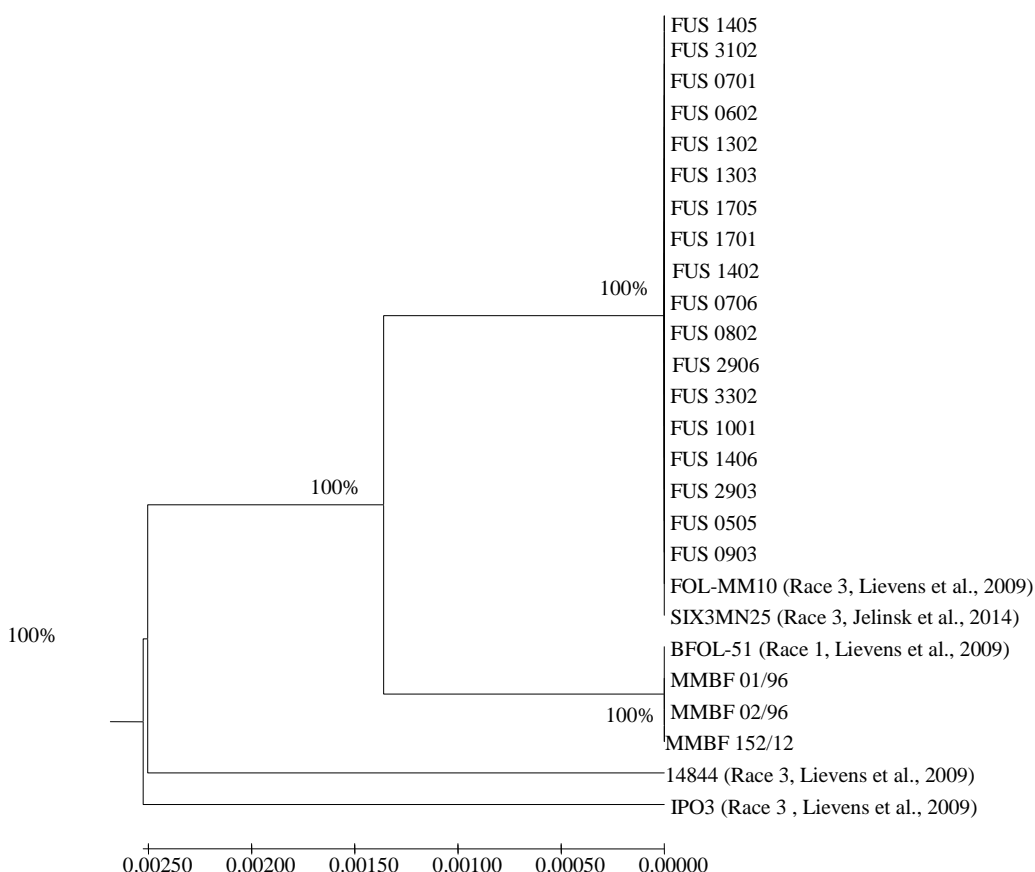


Figura 6. Árvore filogenética baseada na sequência SIX3 de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, calculado pelo método UPGMA. Realizado com o programa MEGA 7. A análise envolveu 26 sequências de nucleotídeos. Significância é indicada pelo valor de bootstrap em 1000 repetições. A escala representa o número de substituição a cada 100 nucleotídeos. 14844 e IPO3- outros isolados de FOL identificados quanto a raça, cujas sequências estão disponíveis no Genbank.

O grupo 2 compreendeu quatro isolados (MMBF 01/96, raça 1, MMBF 02/96 e MMBF 152/12, ambos raça 2) associados ao isolado BFOL-51 caracterizado por Lievens et al. (2009) como raça 1. Assim como neste trabalho, mas utilizando as técnicas de RAPD, ISSR e IGS, Amaral et al. (2013), encontraram próxima correlação entre as raças 1 e 2 e uma distinção destas em relação a raça 3. O que revela a dificuldade na diferenciação entre as raças 1 e 2.

O grupo 3 (14844) e o grupo 4 (IPO3) foi formado por isolados obtidos no Genbank como exemplo de sequência para a raça 3 de FOL, não se associando a nenhum dos isolados estudados.

4 CONCLUSÕES

1. A raça 3 de FOL está amplamente disseminada em áreas de produção de tomate em Nova Friburgo, RJ;
2. Todos os isolados de FOL obtidos na região foram da raça 3, e este predomínio deve-se ao cultivo de cultivares resistentes às raças 1 e 2 do patógeno;
3. A identificação da raça por inoculação em variedades diferenciadoras coincidiu em 100% dos casos com a identificação pelo sequenciamento do DNA dos 24 isolados;
4. Os iniciadores de Van de Does et al. (2008) e Lievens et al. (2009) não foram eficientes na discriminação das raças dos 24 isolados coletados em Nova Friburgo, identificados como sendo da raça 3, nem dos isolados usados como padrão das raças 1 e 2 de FOL;
5. O conjunto de iniciadores de Hirano e Arie (2006), não foi eficiente para discriminar isolados das raças 1 e 2 de FOL, por apresentarem padrões de amplificação similares, mas foi eficiente para diferenciar os isolados das raças 1 e 2 dos da raça 3;
6. Os iniciadores de Gonçalves (2015), não foram eficientes para discriminar isolados da raça 2 e não apresentou amplificação para os isolados usados como padrão desta raça;
7. O sequenciamento gênico permitiu a identificação dos isolados das raças 1 e 2 e a diferenciação destes em relação à raça 3 de FOL;
8. O sequenciamento gênico dos isolados apresentou identidade igual a 100% na seqüência de DNA com outros isolados da mesma raça presentes no Genbank (NCBI);
9. Não foi possível diferenciar isolados das raças 1 e 2 por seqüenciamento com o uso do gene SIX3 devido as sequencias idênticas dessas raças para o referido gene.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plants diseases caused by fungi: vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). In: **Plant Pathology**, 2005. cap. 11, p. 523-526.
- ALEXANDER, L. J.; TUCKER, C. M. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Agricultural Research**, v. 70, p. 303-313, 1945.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; M (Ed.). **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 53-90.
- AMARAL, D. O. J.; ALMEIDA, C. M. A.; MALAFAIA, C. B.; CORREIA, M. T. S.; LIMA, V. L. M.; SILVA, M. V. Identification of races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by molecular markers. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 20, p. 2324-2331, 2013.
- ARRUDA, S. C. Murcha de *Fusarium* do tomateiro. **Biológico**, São Paulo, v. 7, n. 7, p. 122-200, 1941.
- BARBOZA, E. A.; CABRAL, C. S.; GONÇALVES, A. M.; REIS, A.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 1, 2013.
- BAYSAL, Ö.; SIRAGUSA, M.; IKTEN, H.; POLAT, I.; GÜMRÜKCÜ, E.; YIGIT, F.; DA SILVA, J. T. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and their genetic discrimination by molecular markers in West Mediterranean region of Turkey. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 74, n. 1, p. 68-75, 2009.
- BIJU, V. C.; FOKKENS, L.; HOUTERMAN, P. M.; REP, M.; CORNELISSEN, B. J. Multiple evolutionary trajectories have led to the emergence of races in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 4, p. 1-20, 2017.
- BOOTH, C. **The Genus *Fusarium***. Kew: England. Commonwealth Mycological Institute, 1971. 237p.
- BOOTH, C. ***Fusarium*: Laboratory guide to the identification of major species**. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, 1977. 58p.
- BOIX-RUÍZ, A.; GÁLVEZ-PATÓN, L.; DE CARA-GARCÍA, M.; PALMERO-LLAMAS, D.; CAMACHO-FERRE, F.; TELLO-MARQUINA, J. C. Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 4, p. 471-483, 2015.
- CARVALHO, A. O. **Influência da fonte de nitrogênio sobre o pH rizosfera e sobre a colonização de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder e Hansen**. 2003. 79f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, v. 22, n. 11, p. 47-52, 1947.

ÇOLAK, A.; BIÇICI, M.; PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* of tomato in protected tomato-growing areas of the eastern Mediterranean region of Turkey. **Turk J Agric For**, v. 37, p. 457-467, 2013.

DINGHRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Long-Term Storage of plant pathogens. In: **Basic Plant Pathology Methods**. USA: Lewis Publishers. 2nd. Edition. 2000, p. 61-66.

DI PIETRO, A.; MADRID, M. P.; CARACUEL, Z.; DELGADO-JARANA, J.; RONCERO, M. I. G. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Mol Plant Pathol**, v. 4, p. 315-326, 2003.

DORDEVIC, M.; VATCHEV, T.; GIREK, Z.; SEVIC, M.; ZECEVIC, B.; ZDRAVKOVIC, J.; IVANOVIC, M. reaction of different tomato cultivars toward race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Genetika**, v. 44, n. 1, p. 109-118, 2012.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. **Anais...** São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

GAO, R.; ZHANG, G. Potential of DNA barcoding for detecting quarantine fungi. **Phytopathology**, v. 103, n. 11, p. 1103-1107, 2013.

GONÇALVES, A. D. M.; AGUIAR, F. M.; LOPES, C. A.; FONSECA, M. E. D. N.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; REIS, A. Primeiro registro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 no Estado de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46.; Reunião Brasileira de Controle Biológico, 11., 2013, **Anais...**Ouro Preto: UFV, 2013.

GONÇALVES, A. D. M. **Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro**. 2015. 121f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

GRATTIDGE, R.; O'BRIEN, R. G. Occurrence of a 3rd race of *Fusarium*-wilt of tomatoes in Queensland. **Plant Disease**, v. 66, p. 165-166, 1982.

HIRANO, Y.; ARIE, T. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of General Plant Pathology**, v. 72, n. 5, p. 273-283, 2006.

HOUTERMAN, P. M.; CORNELISSEN, B. J. C.; REP, M. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 5, p. 1-6, 2008.

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

- HUANG, C. C.; LINDHOUT, P. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* race 1 and race 2. **Euphytica**, v. 93, p. 145–153, 1997.
- INAMI, K.; YOSHIOKA, C.; HIRANO, Y.; KAWABE, M.; TSUSHIMA, S.; TERAOKA, T.; ARIE, T. Real-time PCR for differential determination of the tomato wilt fungus, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, and its races. **J Gen Plant Pathol**, v. 76, n. 2, p. 116–121, 2010.
- JELINSKI, N. A.; BROZ, K.; JONKERS, W.; MA, L. J.; KISTLER, H. C. Effector gene suites in some soil isolate of *Fusarium oxysporum* are not sufficient predictors of vascular wilt in tomato. **Phytopathology**, v. 107, n. 7, p. 842-851, 2017.
- KAWABE, M.; KOBAYASHI, Y.; OKADA, G.; YAMAGUCHI, I.; TERAOKA, T.; ARIE T. Three evolutionary lineages of tomato wilt pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, based on sequences of IGS, MAT1, and pg1, are each composed of isolates of a single mating type and a single or closely related vegetative compatibility group. **J Gen Plant Pathol**, v. 71, n. 4, p. 263–272, 2005.
- LIEVENS, B.; HOUTERMAN, P. M.; REP, M. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 300, n. 2, p. 201-215, 2009.
- MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T. L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A. A. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1757-1764, 2008.
- MICHIELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Mol. Plant Pathol.**, v. 10, p. 311–324, 2009.
- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. ***Fusarium Species: An Illustrated Manual for Identification***. Pennsylvania State University, University Park. 1983, 193p.
- RECORBET, G.; STEINBERG, C.; OLIVAIN, C.; EDEL, V.; TROUVELOT, S.; DUMAS-GAUDOT, E.; GIANINAZZI, S.; ALABOUVETTE, C. Wanted: pathogenesis-related marker molecules for *Fusarium oxysporum*. **New Phytologist**, v. 159, n. 1, p. 73-92, 2003.
- REIS, A.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S.; Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 495-502, 2004.
- REIS, A.; COSTA, H.; BOITEUX, L. S.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 426-428, 2005.
- REIS, A.; BOITEUX, L. S.; URBEN, A. F.; COSTA, H. Estabelecimento e caracterização a nível de raça de uma coleção de isolados *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Embrapa Hortaliças. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, DF, n. 19, 2006. 14p.

- REIS, A.; BOITEUX, L. S. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 451-454, 2007.
- REP, M.; H. VAN DER DOES, H. C.; MEIJER, M.; VAN WIJK, R.; HOUTERMAN, P. M.; DEKKER, H. L.; KOSTER, C. G. D.; CORNELISSEN, B. J. C. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1279–1557. 2004.
- SANTOS, J. R. M. Methodology for screening tomato for *Fusarium* wilt, *Verticillium* wilt, gray leaf spot, early blight, and Septoria leaf spot. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PROCESSING TOMATO, 1.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES, 1., 1996, Recife. **Proceedings...** Alexandria: ASHS Press: IPA, 1997. p. 164-166.
- SOUZA, L. T.; MICHEREFF, S. J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, .D. E. G. T.; FERRAZ, E.; LIMA, G. S. A.; REIS, A. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 102-106, 2010.
- STEENKAMP, E. T.; BRITZ, H.; COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, B. D.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. **Molecular Plant Pathology**, v. 1, n. 3, p. 187-193, 2000.
- SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2003.
- TOKESHI, H.; GALLI, F.; KUROZAWA, C. Nova raça de *Fusarium* do tomateiro em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 23, p. 217- 227, 1966.
- TOKESHI, H.; GALLI, F. Variabilidade de *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Wr) Sny & Hans em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 23, p. 195–209, 1966.
- VAN DER DOES, H. C.; LIEVENS, B.; CLAES, L.; HOUTERMAN, P. M.; CORNELISSEN, B. J. .; REP, M. The presence of a virulence locus discriminates *Fusarium oxysporum* isolates causing tomato wilt from other isolates. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1475-1485, 2008.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S. B.; TAYLOR, J. W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. **PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications**. (eds). New York, USA: Academic Press, 1990, p. 315–322.
- ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. a greedy algorithm for aligning DNA sequences. **J Comput Biol.**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE CULTIVARES DE TOMATEIRO QUANTO À RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 1, 2 E 3 DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

RESUMO

O controle da murcha-de-fusário do tomateiro (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* - FOL), importante doença da cultura, tem sido feito principalmente com o uso de cultivares resistentes. A maior parte das cultivares disponíveis no mercado possuem resistência às raças 1 e 2 de FOL e somente algumas poucas possuem resistência combinada às três raças 1, 2 e 3. A resistência do tomateiro às raças de FOL pode ser completa e raça-específica (qualitativa), portanto sujeita a ser suprimida por novas raças, ou parcial (quantitativa). A maioria das cultivares de tomateiro são referidas pelas empresas como sendo resistente a uma ou duas raças de FOL, e apenas algumas poucas às três raças, porém na maioria das vezes não informa o tipo de resistência presente. Em Nova Friburgo, RJ, produtores de tomate relatam a ocorrência da murcha-de-fusário mesmo com o uso de cultivares resistentes. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo levantar a incidência e distribuição da doença e avaliar o tipo e nível de resistência das cultivares mais plantadas na região às três raças de FOL. O trabalho foi realizado no município de Nova Friburgo, RJ, no período de 2015 a 2017. Inicialmente, identificaram-se as cultivares mais plantadas e a ocorrência de plantas com murchas em 40 propriedades. Amostras de plantas sadias e com sintomas incipientes e avançados de murchas foram analisadas para a presença de descoloração vascular e utilizadas para isolamento a partir dos feixes vasculares. Os isolados obtidos foram identificados e caracterizados com base em características das colônias e patogenicidade ao tomateiro. Uma vez identificadas as cultivares mais plantadas na região, estas foram avaliadas quanto a resistência às três raças de FOL utilizando-se escala de notas de 1 a 5 e classificação em cinco classes de resistência/suscetibilidade com base na média das notas, e porcentagem de infecção do sistema vascular. Como testemunhas utilizaram-se conjunto de cultivares diferenciadoras (Ponderosa, Caline IPA-7, Floradade, *Solanum pennellii* LA-716 e BRS Imigrante) e outras cultivares de interesse. Constatou-se que 35% das unidades produtivas de tomate apresentaram plantas com murcha-de-fusário. Maior frequência de plantas com a doença foi observada nas lavouras com as cultivares Serato F₁ (36%), Siluet (36%), Alambra (14%), Giuliana (7%) e Juliet (7%). Todas as cultivares utilizadas pelos produtores da região apresentaram reação semelhante à imune (SI) à raça 1 de FOL e, SI ou resistência parcial (altamente ou moderadamente resistente – AR, MR) à raça 2. Das 16 cultivares plantadas, somente ‘Aguamiel’ foi resistente à raça 3 de FOL, sendo todas as demais suscetíveis ou altamente suscetíveis a esta raça. Constatou-se, ainda que as informações contidas nas embalagens das empresas sobre a resistência às raças de FOL são incompletas e, muitas vezes, não necessariamente corresponde à reação SI e pode levar a confusão de produtores na hora da escolha.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. Raça 3. Murcha-de-fusário.

ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is an important disease which affects tomato crop. The main control strategy has been made with the use of race-specific resistance. Most of the cultivars available display resistance to race 1 e 2 of FOL and only a few have resistance to the races 1, 2 and 3. Plant resistance to FOL may be complete or race-specific (qualitative) or partial resistance (quantitative). The majority of cultivars are described for the companies as being resistant for one or two races of FOL and only few for the three races, but frequently do not report the type of resistance present. In Nova Friburgo, RJ, tomato producers report the occurrence of *Fusarium* wilt even with the use of resistant cultivars. For this reason, the present work was carried out aiming to study the incidence and distribution of the disease and evaluation of the reaction of commercial cultivar to different isolates obtained from the three races of FOL. The work was carried out in Nova Friburgo, RJ, during the period from 2015 to 2017. 40 family farm units were evaluated in which it was identified the main cultivars adopted and the occurrence of wilt. Harvest was performed in six plants per farm unit. Healthy plants and plants with incipient and advanced symptoms were evaluated to the presence of vascular discoloration. The isolates obtained were identified and characterized by morphological characteristics and pathogenicity tests. Cultivars were evaluated for resistance to the three race of the pathogen. Disease Severity index was evaluated using scale of grades ranging from 1 to 5 grades, as well as, evaluation of vascular discoloration. The cultivars were clustered into five classes of reaction. A set of differential cultivars (Ponderosa, Caline IPA-7, Floradade, *Solanum pennellii* LA-716 and BRS Imigrante) were used as control. 35% of the family farm units presented plants with *Fusarium* wilt. The cultivars Serato F₁ (36%), Siluet (36%), Alambra (14%), Giuliana (7%) and Juliet F₁ (7%) showed higher rate of contaminated plants. All the cultivars used by the farmers behaved as extreme (immune-like) resistant reaction to race 1 of FOL and immune-like or partial resistance (highly or moderately resistant) to race 2. Only Aguamiel cultivar was resistant to race 3 of FOL, while the others behaved as susceptible or highly susceptible. These findings indicated that the information about resistance to FOL races present on the commercial seeds packages are incompletes and rarely correspond to the immune-like reaction. This lack of information may cause mistakes among the farmers when choose the appropriate cultivar to their needs.

Key words: *Solanum lycopersicum*. Race 3. *Fusarium* wilt.

1 INTRODUÇÃO

O município de Nova Friburgo, RJ, produz grande volume de tomate no período de verão, cerca de 22.706,28t., o que corresponde a 15,1% da produção do Estado (EMATER, 2016). Esta produção está concentrada em unidades familiares, em áreas declivosas, sob manejo intensivo e uso de cultivares híbridas do tipo longa vida. Estas cultivares são relatadas pela literatura, ou pelas empresas que as comercializam, como resistentes às raças 1 e 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder e H. N. Hansen (FOL) e, em menor proporção, como resistente também à raça 3. No entanto, relatos crescentes de perdas por murchas em geral e inviabilização de várias áreas para o cultivo de tomateiro vem sendo feitos por técnicos e produtores na região.

Entre as murchas citadas pelos produtores está a murcha-de-fusário, causado por FOL. Esta é uma das doenças mais importantes do tomateiro em todo o mundo (DORDJEVIC et al., 2012). Causa severas perdas em cultivos protegidos e no campo e, devido à capacidade de sobrevivência do patógeno no solo, pode inviabilizar o uso das áreas para a cultura por vários anos (MCGOVERN, 2015). O patógeno, que pode ser transmitido pelas sementes (ELLIOT e CRAWFORD, 1992; REIS e BOITEUX, 2007), causa danos desde o viveiro até a fase adulta no campo. Penetra através do sistema radicular, especialmente na presença de ferimentos, e coloniza os vasos do xilema resultando em interrupção parcial ou total no fluxo de água e nutrientes pela deposição de gomas, tiloses, esporos e micélios o que resulta em visível descoloração dos feixes vasculares (AGRIOS, 2005; MCGOVERN, 2015). Em geral, os sintomas se intensificam a partir do florescimento e frutificação, devido ao aumento da demanda por água e nutrientes e incluem amarelecimento das folhas, murcha e por fim morte da planta.

Entre as medidas básicas de manejo estão as de caráter preventivo como uso de sementes e mudas sadias, limpeza de máquinas e implementos, não movimentação de solo em áreas contaminadas, calagem e rotação de culturas e, uso de cultivares resistentes (DORDJEVIC et al., 2012). No entanto, para que esta medida seja eficiente é necessário que se conheça previamente a(s) raça(s) predominante(s) na região e se identifiquem as cultivares resistentes às raças predominantes.

Até então já foram descritas três raças do patógeno, raças 1, 2 e 3, diferenciáveis pela capacidade de infectar cultivares com diferentes *loci* de resistência (REIS et al., 2005). Genes de resistência a FOL têm sido obtidos de espécies silvestres de *Solanum* e introduzidos com sucesso no tomateiro (BAI e LINDHOUT, 2007). Entre os genes até então relatados estão: genes *I* e *I-1*, encontrados em *S. pimpinellifolium* e *S. pennellii*, que conferem resistência à raça 1; gene *I-2*, encontrado em *S. pimpinellifolium*, que confere resistência à raça 2; gene *I-3* e gene *I-7*, encontrado em *S. pennellii*, no acesso LA-716 e outro em PI414773 respectivamente, que conferem resistência à raça 3 (GONZALEZ-CENDALES et al., 2016). Além da resistência raça-específica de tomateiro à murcha-de-fusário, governada pelos genes *I*, *I-1*, *I-2*, *I-3* e *I-7*, que conferem imunidade às respectivas raças, existem também relatos de resistência parcial que conferem um retardo no processo de infecção e colonização e resultando em sintomas menos severos da doença, caso de cultivares com reação medianamente resistente que possuem resistência parcial ou incompleta, relatada em trabalhos feitos com as raças 1 e 2 de FOL (CARRER-FILHO et al., 2016). Esta resistência parcial é muitas vezes referida como tolerância.

No Brasil, as raças 1 e 2 apresenta distribuição generalizada. A raça 3, foi relatada pela primeira vez em plantios comerciais no Estado do Espírito Santo (REIS et

al., 2005) em cultivares resistentes às raças 1 e 2 de FOL, como Alambra, Carmen e Giovana. Posteriormente, foi relatada no Rio de Janeiro (REIS e BOITEUX, 2007), Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2013) e Bahia (BARBOZA et al., 2013). O relato simultâneo, ou rápida distribuição da raça 3, em regiões geograficamente distantes, foi associado ao uso de sementes contaminadas (REIS e BOITEUX, 2007), reportado desde 1922 por Elliot e Crawford. Outras formas de disseminação da doença estão relacionadas ao uso de mudas infectadas e movimentação de solo contaminado e reutilização de água contaminada (AJILOGBA e BABALOLA, 2013).

Pelo quadro exposto, a identificação e indicação de cultivares resistentes às três raças do patógeno devem ser feitas para as regiões com relatos, ou suspeita de ocorrência das três raças do patógeno. No entanto, as cultivares citadas como resistentes às três raças disponíveis hoje no Brasil são poucas como BRS Imigrante lançada pela Embrapa Hortaliças (EMBRAPA HORTALIÇAS, 2013) e Aguamiel (VILMORIN, 2017) e TSV 770 Cromo (TECNOSEED, 2017).

Observações de campo e relatos de técnicos e produtores de tomate, porém, levam a dúvidas quanto à natureza e ao espectro da resistência de algumas cultivares, podendo ser estas apenas de natureza parcial a algumas das raças do patógeno.

Assim, tendo em vista o relato de ocorrência generalizada da murcha-de-fusário no município de Nova Friburgo, RJ, mesmo em cultivares relatadas como resistentes ao patógeno desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de levantar a incidência e distribuição da doença e avaliar o tipo e nível de resistência das cultivares mais plantadas na região às três raças de FOL.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em três Associações de Produtores do Município de Nova Friburgo, RJ, Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, (localizado na latitude de 22° 17' 14''S e longitude de -42° 32' 01''W e com temperatura média anual de 18,8°C) no período de 2015 a 2017.

2.1 Levantamento das Cultivares Plantadas e da Incidência de Murcha-de-Fusário

O levantamento foi realizado na safra de verão de 2015, no período de janeiro a março, em 40 lavouras localizadas em três comunidades. Nos levantamentos, anotaram-se as cultivares plantadas e relatos de ocorrência de plantas com murchas. Em seguida, coletaram-se amostras de plantas sadias e com sintomas incipientes e avançados de murchas e transportaram-nas para o Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes da UFRRJ (LabEPS) para isolamento e diagnose. As plantas foram avaliadas quanto a presença de descoloração vascular. Em seguida para a confirmação da presença do patógeno, seções de aproximadamente 0,5 cm do xilema de cada planta foram imersas em solução de álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio a 0,1% durante 1 minuto e posteriormente lavados com água esterilizada, três vezes, e secos em papel esterilizados (ALFENAS et al., 2007). Fragmentos foram transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) e incubados à 25°C a 12 horas de luz. Os isolados obtidos foram inoculados em mudas de tomateiro para cumprir os Postulados de Koch, reisolados e preservados em solo e óleo mineral (DINGHRA e SINCLAIR, 2000) e caracterizados morfológicamente sob microscopia ótica conforme BOOTH (1977) e NELSON et al. (1983).

2.2 Avaliação das Cultivares mais Plantadas Quanto a Resistência às Raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Avaliou-se a reação das cultivares de tomate plantadas nas respectivas comunidades quanto a resistência às raças 1, 2 e 3 de FOL. Como controle, utilizaram-se a série de cultivares diferenciadoras: Ponderosa (suscetível às raças 1, 2 e 3), Caline IPA 7 (Resistente à raça 1), Floradade (Resistente às raças 1 e 2), *Solanum pennellii* LA-716 e BRS Imigrante (resistente às raças 1, 2 e 3) (Tabela 10).

Tabela 10. Genótipos avaliados quanto à resistência às raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, empresa comercializadora e informação sobre a resistência às raças do patógeno (continua).

Genótipo	Empresa	Resistência informada
¹ Lumi	Sakata	1 e 2
¹ Natália	Sakata	1 e 2
¹ Aguamiel	Vilmorin	1, 2 e 3
¹ TSV 770 Cromo	TecnoSeed	1, 2 e 3
¹ Siluet	Syngenta	1 e 2
¹ Itaipava F ₁	Agristar	1 e 2
¹ Alambra	Clause	1 e 2
¹ Serato F ₁	Topseed	1 e 2

Tabela 10. Continuação.

¹ Débora Plus	Sakata	1 e 2
² Carina Ty	Sakata	1 e 2
² Ivety	Sakata	1 e 2
² Tyler	Sakata	1 e 2
² San Marzano	Isla	<i>Si</i>
² Forty	Syngenta	1 e 2
² Carolina	Feltrin	1 e 2
² PAB	LabEPS	<i>Si</i>
³ Ponderosa	LabEPS	-
³ Caline IPA-7	LabEPS	1
³ Floradade	LabEPS	1 e 2
³ LA-716	LabEPS	1, 2 e 3
³ BRS Imigrante	Agrocinco	1, 2 e 3

¹Cultivares utilizadas pelos produtores de Nova Friburgo, RJ; ²Outras cultivares; ³Variedades diferenciadoras de raças. *Si*, sem informação.

Como inóculo, utilizaram-se suspensão de esporos (1×10^6 microconídios mL⁻¹) de três isolados de FOL - MMBF 01/96 (raça 1), MMBF 02/96 (raça 2), adquiridos junto à Coleção de Culturas Fúngicas Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”, Instituto Biológico, SP, e FUS (2903) (raça 3), pertencente à coleção do LabEPS da UFRRJ. Como testemunhas, utilizaram-se plantas tratadas apenas com água.

As mudas das respectivas cultivares foram produzidas em casa-de-vegetação do Departamento de Solos da UFRRJ e inoculadas aos 20 dias após o semeio. Para tanto, cortaram-se as extremidades das raízes ao qual foram submersas em suspensão de conídios e transplantadas para tubetes contendo a mistura de solo, areia e substrato autoclavados na proporção de 1:1:1. Logo após o transplante, adicionou-se 2 mL da suspensão ao solo. Semanalmente, adubaram-se as plantas com solução de Hoagland e Arnon (1950) para evitar desbalanço nutricional.

Avaliaram-se as plantas aos 18 dias após a inoculação utilizando-se escala de notas (N) de Santos (1997), onde: (1) plantas sem sintomas; (2) plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; (3) plantas com escurecimento vascular e com murcha ou amarelecimento foliar; (4) plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar; (5) plantas mortas. Com as notas obtidas classificaram-se as cultivares utilizando-se a escala de Reis et al. (2004), onde: 1,0 = semelhante à imune (SI); 1,1-2,0= altamente resistente (AR); 2,1-3,0= medianamente resistente (MR); 3,1-4,0= suscetível (SU); 4,1-5,0= altamente suscetível (AS).

Avaliou-se também a massa fresca da parte aérea (MFPA), comprimento da parte aérea (CPA) e porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) por FOL. Com base na MFPA das plantas inoculadas e nas não inoculadas, testemunhas, estimou-se a massa fresca relativa das plantas em função da inoculação (MFR), onde $MFR = (MFPA \text{ planta inoculada} / MFPA \text{ planta controle}) \times 100$. O crescimento relativo (CR) foi estimado com: $CR = (CPA \text{ planta inoculada} / CPA \text{ planta controle}) \times 100$. Determinou-se a PIV em cortes longitudinais de todas as hastes seguidas de observação e medição da extensão da descoloração vascular (ED) e da altura das hastes (AH). Calculou-se a porcentagem de infecção vascular (PIV) por meio da relação $(ED/AH) \times 100$ (CARVALHO, 2003).

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado com 21 genótipos e sete repetições, representada por uma planta cada. Os resultados obtidos foram submetidos a tratamento estatístico utilizando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2000). Realizou-se teste de normalidade (Teste de Lilliefors) e de homogeneidade das variâncias (COCHRAN e BARTLETT, 1947) e, posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o teste F ($p < 0,05$) e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram visitadas 40 unidades de produção e identificado o cultivo de 15 cultivares distintas e o relato de ocorrência de murchas/infecção vascular em 92,5% das lavouras, sendo 35% destas diagnosticadas como sendo murcha-de-fusário, causada por FOL. As cultivares plantadas eram, na ordem: Serato F₁, Siluet, Alambra, Aguamiel, TSV 770 Cromo, Itaipava F₁, Lumi, Natália, Juliet F₁, Paron, Diana, Caete, Pizzadoro, Débora Plus e Giuliana. Identificou-se a ocorrência de murcha-de-fusário em 35% das propriedades, sendo estas com cultivo de Serato F₁ (36%), Siluet (36%), Alambra (14%), Giuliana (7%) e Juliet F₁(7%), todas elas relatadas como resistentes às raças 1 e 2 de FOL (Tabela 10). Com base neste resultado, infere-se que a doença na região está associada à presença generalizada da raça 3 de FOL e que opções de cultivares resistentes à esta raça devem ser disponibilizadas para os produtores. As cultivares Giuliana, Juliet F₁, Pizzadoro, Paron, Diana e Caeté não foram utilizadas nos ensaios seguintes pela falta de semente no mercado.

Do total de 21 cultivares avaliadas, quatro exibiram infecção no sistema vascular (acima de 50%) quando inoculadas com a raça 1: Ponderosa, AS (PIV=100% e N=4,86), cultivar controle suscetível a todas as raças; Carolina, SU (PIV=80% e N=3,5), PAB, AS (PIV=93 e N=4,1) e San Marzano, AS (PIV=100% e N=4,8). Dentre estas, somente a cultivar Carolina possui especificação da empresa (FELTRIN SEMENTES, 2017) como resistente e ou/tolerante às raças 1 e 2 de FOL, o que não foi confirmado na presente avaliação. Nenhuma das demais 17 cultivares apresentaram sintomas e por isso foram classificadas como semelhante à imune (SI), resultado este que confirma a indicação informada pelas respectivas empresas fornecedoras (Figura 7A e Figura 7B e Tabela 10). Este resultado confirma ainda que todas as cultivares plantadas na região estudada são resistentes à raça 1 de FOL.

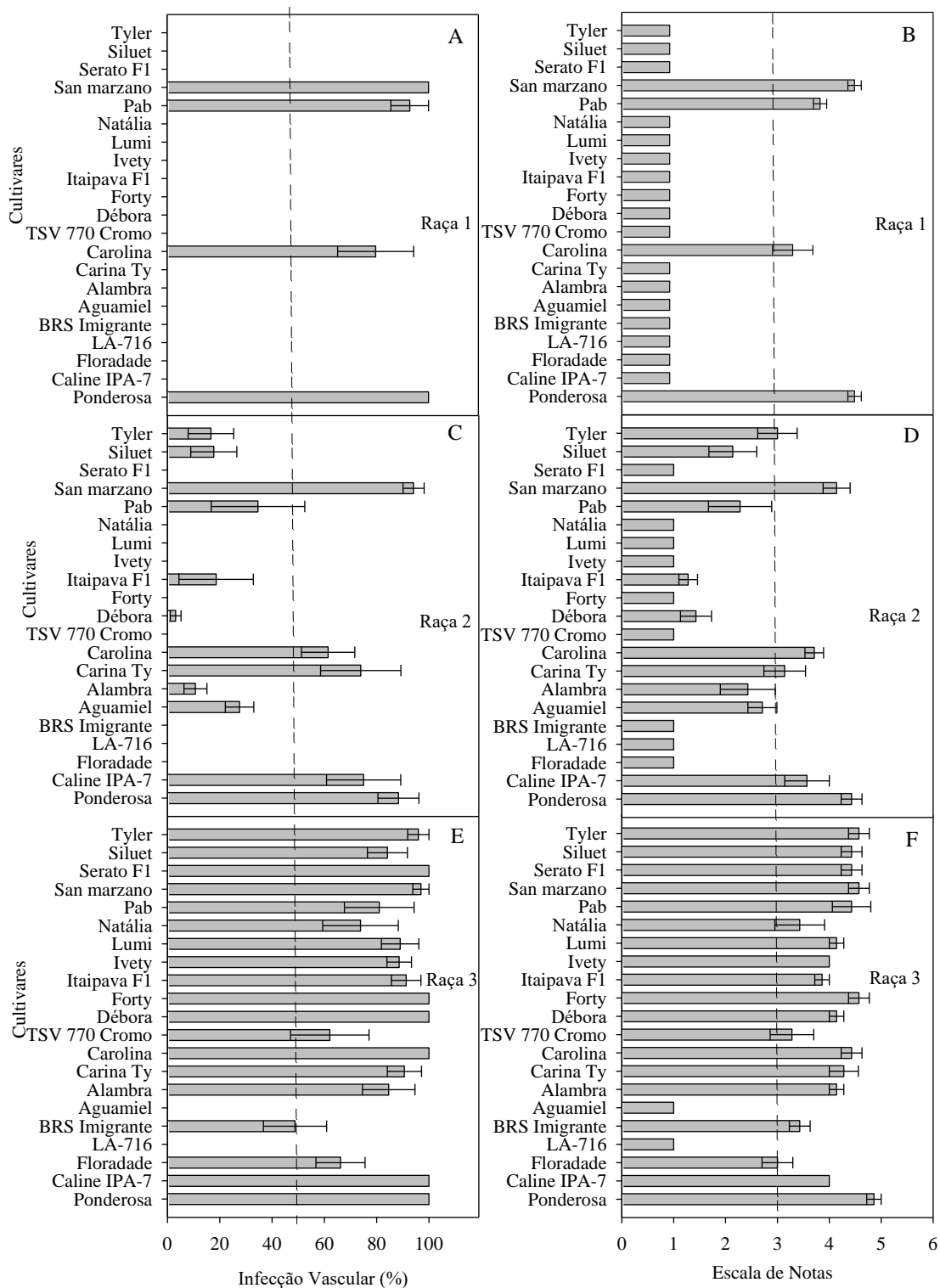


Figura 7. Severidade média da doença medida pela porcentagem de infecção, PIV, do sistema vascular e escala de notas, N (REIS et al., 2004), onde: 1,0- semelhante a imune (SI); 1,1 a 2,0- altamente resistente (AR); 2,1 a 3,0- medianamente resistente (MR), 3,1 a 4,0- suscetível (SU) e; 4,1 a 5- altamente suscetível (AS).

Perfil diferente de resistência foi exibido em plantas inoculadas com a raça 2 (MMBF 02/96) do patógeno com distribuição de cultivares nas cinco classes de reação

prevista por Reis et al. (2004). Cerca de seis cultivares comportaram-se como SI com PIV=0% e N=1: TSV 770 Cromo, Forty, Ivety, Lumi, Natália e Serato F₁, além dos padrões resistentes à raça 2, Floradade, LA-716 e BRS Imigrante, portadores do locus *I-2*, que confere resistência à raça 2. Todas essas cultivares também foram resistentes a raça 1 de FOL, e confirma a introgressão simultânea dos genes *I-1* e *I-2* (CARRER-FILHO et al., 2016) (Figura 7C e Figura 7D).

Duas cultivares comportaram-se como altamente resistentes (AR) Débora (PIV=3,1% e N=1,4) e Itaipava F₁ (PIV=18,6% e N=1,3), indicando possuem apenas resistência parcial à raça 2, apesar de as empresas a indicarem como resistentes a esta raça (Tabela 10, Figura 7C e Figura 7D). A incidência de plantas com murcha neste ensaio foi de 28,6% em Débora e Itaipava F₁, índice baixo o que pode indicar mistura de sementes na condução do experimento ou mistura existente no lote de sementes comercializado pelas empresas. Corrêa et al. (2012) e Clemente (2017) relatam a cultivar Débora como resistente as raças 1 e 2 de FOL (sem especificação para resistência total ou parcial). As cultivares Aguamiel (PIV=27% e N=2,71), Alambra (PIV=11% e N=2,43), Siluet (PIV=18% e N=2,14) e Tyler (PIV=17% e N=3), apesar de indicadas como resistentes à raça 2 (Tabela 10), comportaram-se como medianamente resistentes (MR) assim como PAB (PIV=35% e N=2,28), para a qual não existia ainda esta informação. A incidência de plantas com murcha no ensaio foi de 86%, 57%, 57%, 57% e 43% para Aguamiel, Alambra, Siluet, Tyler e PAB, respectivamente. Estes resultados sugerem que estas cultivares possuem apenas resistência parcial e que a resposta ao patógeno pode estar sujeita a variações em função das condições de ambiente. A existência de cultivares com reação de resistência parcial (MR) para esta raça também foram relatadas em diversos trabalhos, contudo essa instabilidade fenotípica não é desejada devido a facilidade de quebra de resistência pelo patógeno, o que dificulta o trabalho de melhoristas (CARRER-FILHO et al., 2016).

As cultivares Carina Ty (PIV=74% e N=3,14) e Carolina (PIV=61% e N=3,71), no entanto, apesar de referidas como resistentes às raças 1 e 2, comportaram-se como suscetíveis, similar à Caline IPA-7 (PIV=75% e N=3,57), utilizada como padrão suscetível à raça 2. Como altamente suscetíveis, AS, identificaram-se Ponderosa (PIV=88% e N=4,43), e San Marzano (PIV=94% e N=4,14) (Figura 7C e Figura 7D). Nestes genótipos, observaram-se 86 a 100% de incidência de plantas doentes.

Para a raça 3, com exceção de LA-716 (controle resistente a raça 3) e Aguamiel que exibiram resposta semelhante a imune (SI), e Floradade com resposta medianamente resistente (MR), todas as demais cultivares comportaram-se como suscetível (SU) ou altamente suscetível (AS), com notas médias acima de 3 e infecção acima de 40%. A cultivar BRS Imigrante enquadrou-se entre as cultivares suscetíveis apresentando o menor nível de infecção 48,77% e nota média de 3,43. Esta cultivar também foi utilizada como padrão de resistência à raça 3, no entanto, exibiu a doença (Figura 7E, Figura 7F e Figura 8).

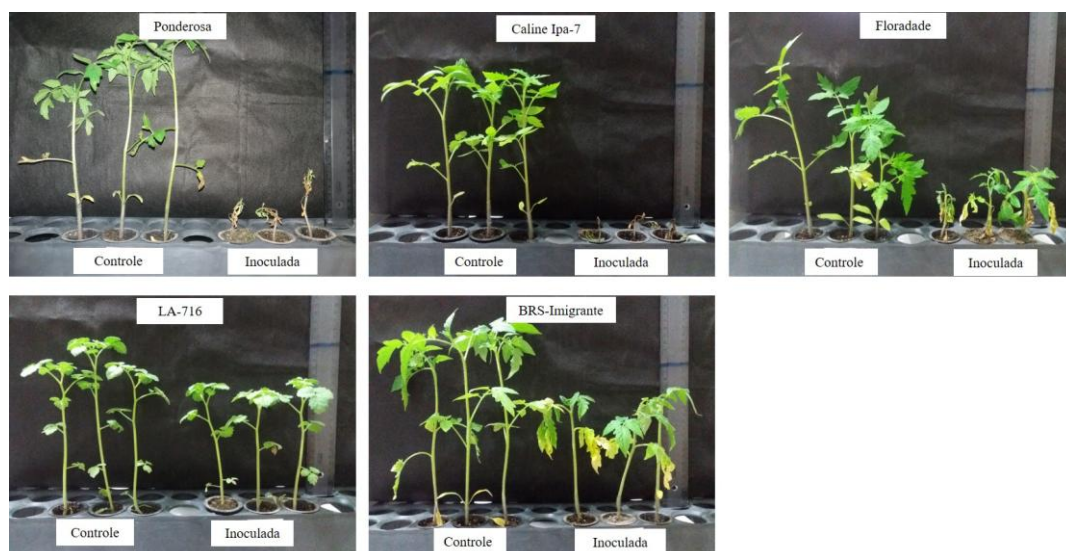


Figura 8. Cultivares diferenciadoras de raça de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inoculadas com a raça 3 (FUS 2903), coletado em Nova Friburgo, RJ, em condições de casa de vegetação.

Entre todas as cultivares comerciais avaliadas somente a Aguamiel mostrou resistência completa, SI, às raças 1 e 3 e resistência parcial, MR, à raça 2. O uso de um único isolado para testar a resistência é questionado por alguns autores, que sugerem testes com múltiplos isolados para se obter informações mais concisas (AKRAM et al., 2014). Segundo Carrer Filho et al. (2016), a resistência parcial à raça 2 pode ser explicada devido a variação da expressividade do gene *I-2* na planta hospedeira assim como a variabilidade patogênica do patógeno que podem condicionar diferentes níveis de resposta da planta à infecção em função da agressividade do isolado utilizado.

Outros fatores que podem interferir na expressão da doença em teste de cultivares são temperatura, idade do hospedeiro, métodos de inoculação entre outras variáveis (DAVIS et al., 1996; BOIX-RUÍZ et al., 2015). No presente ensaio, utilizaram-se os critérios prescritos por diferentes autores (SANTOS JÚNIOR et al., 2009; SOUZA et al., 2010; CARRER-FILHO et al., 2016) para avaliação de resistência de tomate a FOL: método de inoculação, idade da planta, condições de ambiente e quantidade de inóculo adequada para infecção. Dessa forma, estudos de estabilidade da reação das cultivares a diferentes isolados de mesma raça de FOL são importantes para confirmar e encontrar um potencial genótipo para controle da doença (SOUZA et al., 2010). Estudos a campo e exposição em áreas com a presença do patógeno também são de extrema importância para a confirmação da resistência de cultivares de tomateiro (CANTÚ et al., 2014). Muitas cultivares de tomate melhoradas convencionalmente possuem resistência às raças 1 e 2 de FOL e poucas possuem resistência combinada as três raças (MCGOVERN, 2015).

A variação na massa fresca das plantas inoculadas em relação às plantas não inoculadas também permitiu avaliar o efeito das três raças do patógeno sobre as diferentes cultivares. De forma geral, observou-se redução na massa fresca das plantas quando inoculadas com as três raças do patógeno, principalmente com a raça 3. Tendo-se como base o agrupamento das médias de MFR pelo teste Scott-Knott, observa-se que as cultivares Floradade, LA-716, BRS Imigrante, Alambra, Itaipava F₁, Ivety, Siluet e Tyler, todas com reação SI à raça 1, não tiveram redução significativa de massa fresca quando inoculadas com o isolado desta raça. Nota-se, ainda, que a maior redução de acúmulo de massa fresca foi observada nas plantas das cultivares com reação AS,

Ponderosa, PAB e San Marzano. De forma geral, a redução no acúmulo de massa fresca devido ao isolado da raça 2 foi menor que o observado para as raças 1 e 3. E, da mesma forma, apenas algumas cultivares com reação SI, não tiveram redução significativa nos valores de MFR como Floradade, BRS Imigrante, TSV 770 Cromo, Ivety, Lumi, Natália e Serato F₁, além das AR e MR como Débora e Alambra. Para a raça 3, todas as plantas tiveram redução de massa fresca (MFR<100%), inclusive os genótipos com reação SI, LA-716 (MFR = 60%) e Aguamiel (MFR =88%). Floradade e BRS Imigrante, que apresentaram reação SI às raças 1 e 2 de FOL somente apresentaram redução da massa fresca quando inoculadas com o isolado da raça 3, MFR = 47% e 59%, respectivamente e as plantas de LA-716, reação SI às três raças, apresentou redução de massa fresca quando inoculadas com isolados das três raças (Tabela 11).

Tabela 11. Efeito de genótipo sobre a massa fresca relativa da parte aérea (MFR), crescimento relativo das mudas (CR), porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) e classificação quanto à resistência às raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Genótipo	Raça 1				Raça 2				Raça 3			
	MFR (%)	CR (%)	PIV (%)*	Classe	MFR (%)	CR (%)	PIV (%)*	Classe	MFR (%)*	CR (%)*	PIV (%)*	Classe
Ponderosa ¹	5 d	9 d	100 a	AS	24 c	33 c	88 a	AS	4 d	8 c	100 a	AS
Caline IPA-7 ¹	34 c	50 c	0 c	SI	39 c	52 c	75 a	SU	31 d	49 b	100 a	SU
Floradade ¹	104 a	95 b	0 c	SI	91 a	84 b	0 c	SI	47 c	41 c	66 b	SU
LA-716 ¹	89 a	82 b	0 c	SI	71 b	83 b	0 c	SI	60 b	67 b	0 c	SI
BRS Imigrante ¹	95 a	89 b	0 c	SI	92 a	93 a	0 c	SI	59 b	63 b	48 b	SU
Aguamiel ²	81 b	99 a	0 c	SI	65 b	84 b	27 b	MR	88 a	92 a	0 c	SI
Alambra ²	104 a	91 b	0 c	SI	83 a	96 a	11 b	MR	36 c	43 c	84 a	AS
Carina T _y ³	64 b	71 b	0 c	SI	37 c	51 c	74 a	SU	22 d	27 c	90 a	AS
Carolina ³	36 c	52 c	80 b	SU	54 c	71 b	61 a	SU	13 d	25 c	100 a	AS
TSV 770 Cromo ²	49 c	61 c	0 c	SI	81 a	82 b	0 c	SI	42 c	51 b	62 b	SU
Débora ²	78 b	88 b	0 c	SI	85 a	102 a	3c	AR	19 d	36 c	100 a	AS
Forty ³	60 b	73 b	0 c	SI	75 b	96 a	0 c	SI	41 c	42 c	100 a	AS
Itaipava F ₁ ²	97 a	107 a	0 c	SI	70 b	91 a	19 b	AR	29 d	46 b	91 a	SU
Ivety ³	107 a	113 a	0 c	SI	101 a	99 a	0 c	SI	41 c	63 b	88 a	SU
Lumi ²	85 b	90 b	0 c	SI	89 a	80 b	0 c	SI	42 c	50 b	89 a	AS
Natália ²	70 b	92 b	0 c	SI	97 a	97 a	0 c	SI	40 c	59 b	74 b	SU
Pab ⁴	29 c	40 c	93 a	AS	75 b	76 b	35 b	MR	13 d	16 c	81 a	AS
San Marzano ³	2 d	7 d	100 a	AS	39 c	45 c	94 a	AS	12 d	19 c	97 a	AS
Serato F ₁ ²	82 b	89 b	0 c	SI	85 a	90 a	0 c	SI	24 d	37 c	100 a	AS
Siluet ²	92 a	100 a	0 c	SI	73 b	93 a	18 b	MR	25 d	34 c	84 a	AS
Tyler ³	106 a	108 a	0 c	SI	65 b	77 b	17 b	MR	20 d	27 c	96 a	AS
CV%	28,05	24,49	29,59		24,47	19,67	54,86		49,92	45,43	17,80	

¹Cultivares usadas como controle, Ponderosa (suscetível as raças 1, 2 e 3), Caline IPA-7 (resistente a raça 1), Floradade (resistente a raça 2) e LA-716 e BRS Imigrante (resistentes a raça 3). ²Cultivares comerciais utilizadas pelos produtores de Nova Friburgo, RJ. ³ Outras cultivares comerciais. ⁴ Acesso do Banco de Germoplasma do LabEPS. Média seguida pela mesma letra minúscula entre colunas não diferem estatisticamente pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. * Dados transformados $\sqrt{x+1}$.

MFR = (MFPA planta inoculada/MFPA planta controle) x 100; CR = (CPA planta inoculada/CPA planta controle) x 100; I = (Extensão da haste necrosada/extensão total da haste)*100; N= classificação com base na escala de notas de Santos (1997) e Reis et al. (2004), onde: SI= 1,0; AR=1,1-2,0; MR= 2,1-3,0; SU= 3,1-4,0; AS= 4,1-5,0.

Redução no crescimento de plantas quando inoculadas com FOL é relatada por Huang e Lindhout (1997) em plantas suscetíveis e resistentes e esta redução pode estar relacionado à resposta de defesa da planta ao processo de infecção. Safiuddin et al. (2012) também observaram redução em parâmetros de desenvolvimento como massa fresca, número de frutos, assim como no crescimento das hastes como observado neste trabalho.

Os isolados das três raças de FOL causaram redução de crescimento das hastes das plantas, tendo sido este efeito mais acentuado pelo isolado da raça 3, seguido do isolado da raça 1 e do da 2, similar ao efeito sobre o acúmulo de massa fresca. Para a raça 1, a maioria das plantas tiveram redução de crescimento das hastes, mesmo as com reação SI, exceto Aguamiel, Itaipava F₁, Ivety, Siluet e Tyler. Para a raça 2, cerca de quatro cultivares com reação SI tiveram redução significativa no crescimento das hastes, exceto BRS imigrante, Forty, Ivety, Natália e Serato F₁. E para a raça 3, todas as cultivares tiveram redução significativa no crescimento das hastes, exceto Aguamiel (CR=92), sendo esta redução de até mais de 50%. Esse resultado, assim como o de redução de massa fresca (MFR) indica uma alta agressividade do isolado desta raça (Tabela 11).

Retardo no desenvolvimento das plantas, seja pela redução no acúmulo de massa fresca seja do crescimento, é comum em plantas com murcha-de-fusário e decorre do bloqueio dos vasos do xilema devido ao crescimento das hifas e produção de esporos dentro dos mesmos assim como acúmulo de tiloses, calose, gomas e géis produzidos pela planta hospedeira em resposta a infecção (AGRIOS, 2005; GONZALEZ-CENDALES et al., 2016). Isso causa impedimento à passagem de água e nutrientes e provoca sintomas como amarelecimento e murchas, com conseqüente redução no acúmulo de biomassa da parte aérea e teor de água. Esta redução no crescimento e acúmulo de biomassa é tanto mais severo quanto mais precoce for a infecção (LOPES et al., 2005). Em plantas resistentes a redução do crescimento pode ocorrer devido a desregulação do metabolismo primário como resposta de defesa a infecção por potenciais patógenos (ROJAS et al., 2014). Os patógenos ao produzirem elicitores podem ativar uma combinação de defesas químicas pré-existentes, produzidas e estruturais nas plantas na qual conseguem se defender totalmente ou parcialmente do agente patogênico (AGRIOS, 2005).

Dessa forma, a reação das cultivares comerciais testadas aos isolados de FOL revelam a necessidade de estudos de melhoramento para o encontro e produção de materiais resistentes, estudo esse como relatado desde 1966 por Tokeshi e colaboradores que visem principalmente material de origem básica. Muitas cultivares de tomate melhoradas convencionalmente possuem resistência as raças 1 e 2 de FOL e poucas possuem resistência combinada as três raças (MCGOVERN, 2015).

4 CONCLUSÕES

1. Cerca de 35% das unidades produtivas de tomate na região avaliada apresentaram plantas com murcha-de-fusário;
2. Maior frequência de plantas com murchas foi observado nas cultivares Serato F₁ (36%), Siluet (36%), Alambra (14%), Giuliana (7%) e Juliet F₁ (7%);
3. Todas as cultivares utilizadas pelos produtores da região são SI à raça 1 de FOL e SI ou portadoras de resistência parcial (AR ou MR) à raça 2 de FOL;
4. Dentre as cultivares utilizadas pelos produtores da região, apenas TSV 770 Cromo, Forty, Ivety, Lumi, Natália e Serato F₁, além de BRS Imigrante, apresentam reação SI à raça 2 de FOL;
5. Várias das cultivares citadas como resistentes à raça 2, possuem apenas resistência parcial como Débora e Itaipava F₁, que comportaram-se como altamente resistentes (AR) e Aguamiel, Alambra, Siluet e Tyler, como medianamente resistentes (MR);
6. As cultivares Carina T_Y e Carolina, apesar de informadas como resistentes à raça 2, são suscetíveis;
7. Todas as cultivares plantadas, exceto Aguamiel, são suscetíveis ou altamente suscetíveis à raça 3 de FOL;
8. A raça 3, provavelmente, é predominante da região, haja vista o fato de cultivares resistentes às raças 1 e 2 terem apresentado a doença;
9. As informações contidas nas embalagens das empresas sobre a resistência às raças de FOL não necessariamente correspondente à reação SI e pode levar a confusão de produtores na hora da escolha.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plants diseases caused by fungi: vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). In: **Plant Pathology**. 2005. 922p.
- AJILOGBA, C. F.; BABALOLA, O. O. Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. **Biocontrol Science**, v. 18, n. 3, p. 117-127, 2013.
- AKRAM, W.; ANJUM, T.; AHMAD, A. Basal susceptibility of tomato varieties against different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Int J Agric Biol**, v. 16, p. 171-176, 2014.
- ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; MAFIA, R. G.; GONÇALVES, R. C. Isolamento de fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; M. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. p. 53-90.
- BAI, Y.; LINDHOUT, P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?. **Annals of Botany**, v. 100, n. 5, p. 1085-1094, 2007.
- BARBOZA, E. A.; CABRAL, C. S.; GONÇALVES, A. M.; REIS, A.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in Northeast Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 422, 2013.
- BOIX-RUÍZ, A.; GÁLVEZ-PATÓN, L.; DE CARA-GARCÍA, M.; PALMERO-LLAMAS, D.; CAMACHO-FERRE, F.; TELLO-MARQUINA, J. C. Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 4, p. 471-483, 2015.
- BOOTH, C. *Fusarium - Laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute, Ferry Lane, Kew, Surrey, 1977. 58p.
- CARRER FILHO, R.; DIAS, V. D.; DE OLIVEIRA, R. M.; DE CAMPOS DIANESE, É.; BOITEUX, L. S.; DA CUNHA, M. G. Detecção simultânea de fatores de resistência à murcha de fusário do tomateiro por meio de PCR multiplex. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 8, p. 925-932, 2016.
- CARVALHO, A. O. **Influência da fonte de nitrogênio sobre o pH rizosfera e sobre a colonização de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder e Hansen**. 2003. 79f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- CANTÚ, R. R.; REBELO, J. A.; MILANESI, P. M.; GOTO, R. Reaction and resistance of tomato rootstock to *Fusarium* wilt. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1155-1158, 2014.
- COCHRAN, W. G. The distribution of the largest of a set of estimated variances as a fraction of their total. **Annals of Eugenics**, v. 22, n. 11, p. 47-52, 1947.
- CORRÊA, A. L.; DE ARAÚJO FERNANDES, M. D. C.; DE AGUIAR, L. A. **Produção de tomate sob manejo orgânico**. Niterói: Pesagro-Rio (Programa Rio Rural). 2012, 40p.

CLEMENTE, F. M. V. T. Árvore do conhecimento tomate: Santa Cruz. **Agência Embrapa de informação tecnológica, Embrapa.** Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tomate/arvore/CONT000fa2qor2u02wx5eo01xezls4677uka.html>. Acesso em: 26 jun. 2017.

DAVIS, R. D.; MOORE, N. Y.; KOCHMAN, J. K. Characterisation of a population of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* causing wilt of cotton. **Aust. J. Agr. Res.**, v. 47, n. 7, p. 1143–1156, 1996.

DINGHRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Long-Term Storage of plant pathogens. In: **Basic Plant Pathology Methods**. USA: Lewis Publishers. 2nd. Edition. p. 61-66, 2000.

DORDEVIC, M.; VATCHEV, T.; GIREK, Z.; SEVIC, M.; ZECEVIC, B.; ZDRAVKOVIC, J.; IVANOVIC, M. Reaction of different tomato cultivars toward race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Genetika**, v. 44, n. 1, p. 109-118, 2012.

ELLIOTT, J. A.; CRAWFORD, R. F. The spread of tomato wilt by infected seeds. **Phytopathology**, v. 12, p. 428-434, 1992.

EMATER-RIO. **Relatório por culturas do sistema ASPA/AGROGEO – ano 2015 Rio de Janeiro.** Disponível em: <http://www.emater.rj.gov.br/images/cul2016.htm>. Acesso em: 12 jun. 2017.

EMBRAPA HORTALIÇAS. **BRS-Imigrante: híbrido tipo salada tolerante à begomovírus e *Fusarium* raça 3.** 2013. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1261/tomate-brs-imigrante>. Acesso em: 29 jul. 2017.

FELTRIN SEMENTES. **Tomate Carolina.** Disponível em: <https://www.sementesfeltrin.com.br/Produto/tomate-carolina>. Acesso em: 29 jul. 2017.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA. **Anais...** São Carlos: UFSCar, p. 255-258, 2000.

GONÇALVES, A. D. M.; AGUIAR, F. M.; LOPES, C. A.; FONSECA, M. E. D. N.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; REIS, A. Primeiro registro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 no Estado de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46.; Reunião Brasileira de Controle Biológico, 11., 2013, **Anais...**Ouro Preto: UFV, 2013.

GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI, A. M.; BAKER, B.; MCGRATH, D. J.; JONES, D. A. Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 448-463, 2016.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v. 347, p. 1-32, 1950.

HUANG, C. C.; LINDHOUT, P. Screening for resistance in wild *Lycopersicon* species to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and race 2. **Euphytica**, v. 93, n. 2, p.145-153, 1997.

LOPES, C. A.; REIS, A.; BOITEUX, L. S. Doenças Fungicas. In: LOPES, C.A.; ÁVILA, A. C. **Doenças do tomateiro**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2005, p. 16-51.

MCGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78-92, 2015.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS. W. F. O. ***Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification**. Pennsylvania State University, University Park. 1983, 193p.

REIS, A.; GIORDANO, L. B.; LOPES, C. A; BOITEUX, L. S.; Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *Lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 495-502, 2004.

REIS, A.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 30, n. 4, p. 426-428, 2005.

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

ROJAS, C. M.; SENTHIL-KUMAR, M.; TZIN, V.; MYSORE, K. S. Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 17, p.1-12, 2014.

SAFIUDDIN, A.; SHAHAB, S.; MAZID, M.; AHMED, D. Comparative study of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Meloidogyne incognita* race-2 on plant growth parameters of tomato. **Agricultural Sciences**, v. 3, n. 6, p. 844-847. 2012.

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

SANTOS JÚNIOR, W. N.; CARVALHO, M. R. M.; CABRAL, C. S.; REIS, A. Seleção de híbridos e acessos de tomate para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Hortaliças, 2009.19p.

SOUZA, L. T.; MICHEREFF, S. J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, D. E. G. T.; FERRAZ, E.; LIMA, G. S. A.; REIS, A. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 102-106, 2010.

TECNOSEED. **TSV 770 CROMO**. Disponível em: <http://www.tecnoseed.com.br/produto/ver/395/tomate-tomate-tsv-770-cromo>. Acesso em: 27 jul. 2017.

TOKESHI, H.; GALLI, F.; KUROZAWA, C. Nova Raça de *Fusarium* do tomateiro em São Paulo. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 23, p. 217-227, 1966.

VILMORIN. **Tomate Aguamiel**. Disponível em: <http://www.vilmorin.com.br/>. Acesso em: 27 jul. 2017.

CAPITULO III

MANEJO DO TOMATEIRO EM UNIDADES FAMILIARES DE NOVA FRIBURGO, RJ, E RELAÇÕES COM A MURCHA-DE-FUSÁRIO

RESUMO

A murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), é uma das principais causas de perdas na cultura do tomate. Sua introdução nas lavouras ocorre pelo uso de sementes e mudas contaminadas e, quando estabelecido no local, a sua dispersão ocorre com o preparo do solo, escoamento de solo pela erosão e compartilhamento de implementos contaminados. A intensidade da doença e as perdas causadas dependem diretamente do conjunto de práticas de manejo adotadas. O presente trabalho teve como objetivo fazer um levantamento das práticas de manejo adotadas por produtores familiares no município de Nova Friburgo, RJ, e identificar a relação destas com a ocorrência de murcha-de-fusário. O levantamento foi realizado no período de janeiro a março de 2015 em 40 unidades produtivas com coleta de 241 amostras de material vegetal e de solo. Efetuou-se, ainda, um levantamento sobre histórico de uso das áreas e principais práticas de manejo adotadas, desde o preparo do solo ao destino dos restos culturais. As amostras de solo e plantas foram analisadas para determinação da fertilidade e nutrição da planta, respectivamente. Constatou-se um conjunto de fatores favoráveis à dispersão e sobrevivência do patógeno como cultivo da espécie há mais de 20 anos e a não observação de práticas de conservação como preparo do solo morro abaixo (37,5%) ou em diagonal (57,5%), com máquinas e implementos comunitários (62,5%), em sua maioria sem limpeza prévia (92,5%), incorporação dos restos culturais ao solo (47,5%) e reutilização de estacas de bambu (77,5%). Ainda, apesar de 50% dos produtores fazerem calagem, 75% o fazem sem critério técnico. Maiores índices de infecção foram observados em áreas de maior declividade e menor fertilidade com uma relação direta entre porcentagem de infecção, acidez e teor de Al no solo. A principal estratégia de controle usada é o uso de cultivares resistentes a FOL, sendo a grande maioria destas resistentes apenas às raças 1 e 2. A forma de manejo pode estar contribuindo para a presença e disseminação de FOL na região, que foi verificado em 35% das propriedades.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Manejo de solo. Disseminação. Perdas.

ABSTRACT

Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), is one of the main disease which cause losses in tomato crop. Field introduction occurs through contaminated seeds and seedlings. The dispersion occurs with soil preparation, soil erosion and sharing of contaminated implements. Disease intensity and losses depend of the set of management practices adopted. For this reason, the present work aimed to perform a diagnostic survey of management practices adopted by farmers from Nova Friburgo, RJ, and identify its relation with the occurrence of *Fusarium* wilt. The survey was carried out during the period from January to March 2015 in 40 family farm units. A diagnostic about the areas history and management practices adopted during the crop cycle was made. Harvest of 241 tomato plants and soil was made. Soil and plant samples were analyzed to determine soil fertility and plant nutrition. Results showed a set of favorable conditions for dissemination and survival of the pathogen in the environment. Tomato cultivation for more than 20 years, as well as, no adoption of conservation practices, ie: downhill soil preparation (37,5%), or in diagonal (57,5%), with the use of machines and implements without prior cleaning (92,5%), incorporation of crop remain into the soil (47,5%) and reuse of wooden stakes (77,5%). 50% of farmers do liming, however without technical assistance (75%). Higher infection rates were observed in areas with greater declivity and lower fertility and its was related with disease severity, acidity and rate of Al in the soil. The main disease control strategy is the use of cultivars with race-specific resistance. The cultivars analysed are predominantly resistant to races 1 and 2. Management practices adopted by the farmers can contributed to the dissemination and survival of FOL.

Key words: *Solanum lycopersicum*. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Soil management. Dissemination. Losses.

1 INTRODUÇÃO

O município de Nova Friburgo, localizado na Região Serrana do Estado do Rio de Janeiro, destaca-se como grande produtor de hortaliças, especialmente de tomate e de couve-flor, no verão e inverno, respectivamente. Atualmente, são contabilizados cerca de 3.217 agricultores familiares dos quais 404 produzem tomate (EMATER, 2016). Boa parte do investimento nas áreas é feito na cultura do tomate por ser de elevado custo e rentabilidade. O tomate produzido na região tem como mercado principal a CEASA-RJ de onde é redistribuído para as redes varejistas da capital do Estado e de municípios adjacentes (GRISEL e ASSIS, 2015).

A principal área de produção do município fica localizada na parte sudoeste, rodeada pela Serra do Mar e Parque Estadual dos Três Picos. A topografia local é caracterizada pela presença de serras de relevo irregular onde, entre outras variações, predomina a sucessão brássica, tomate e leguminosa (GRISEL e ASSIS, 2011). A produção é, em sua maioria, em sistema convencional; preparo do solo morro abaixo ou em diagonal, o que acelera processos erosivos; cultivo sucessivo sem pousios; uso elevado de agrotóxicos e especialização em algumas poucas culturas, muitas vezes de uma mesma família botânica (GRISEL, 2011). Além disso, a não correção da acidez do solo, uso excessivo e desequilibrado de fertilizantes e de grandes quantidades de cama de aves, muitas vezes não compostadas, são comuns na região (BHERING et al., 2017). Estas práticas, associadas ao tipo de relevo, favorecem os processos de degradação física, química e biológica dos solos, incluindo o agravamento de problemas fitossanitários. Como consequência, observa-se uma retração da atividade agrícola. Entre os anos 2013 a 2015, houve um grande declínio no número de produtores de tomate na região e no Estado do Rio de Janeiro (-35,31%). Esta retração deve-se, em grande parte, aos graves problemas no manejo da cultura e à redução de produtividade (SILVA e OLIVEIRA, 2016).

Entre os principais problemas estão as perdas por doenças causadas por patógenos habituais do solo como as murchas. Entre estas, está a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL). A murcha-de-fusário causa sintomas como amarelecimento, necrose e murcha das folhas, redução de crescimento e morte das plantas. Estes sintomas externos decorrem da infecção e colonização dos vasos do xilema e consequente resposta da planta como produção de gomas, caloses, tiloses e géis com consequente obstrução ao fluxo de água e nutrientes (GONZALES-CENDALES et al., 2016). Ao final do ciclo, o patógeno sobrevive nos restos culturais de plantas infectadas e na forma de clamidósporos no solo por vários anos.

A disseminação da doença entre as regiões se dá pelo transporte de sementes e mudas contaminadas (MCGOVERN, 2015). Uma vez introduzida, as condições locais como temperatura, características físicas e químicas do solo, fontes e doses de fertilizantes, quantidade inicial de inóculo e suscetibilidade da cultivar utilizada podem determinar diretamente a intensidade e as perdas pela doença. O compartilhamento de máquinas e implementos agrícolas contaminados, a sucessão de cultivos da espécie hospedeira e a não correção da acidez do solo (PEREIRA e PINHEIRO, 2014) são fatores que contribuem para agravar a disseminação local e as perdas pela doença. O controle da doença deve ser feito com a adoção de uma série de práticas de manejo como uso de sementes e mudas sadias (PEREIRA e PINHEIRO, 2014), correção da acidez do solo (CARVALHO et al., 2005), rotação de culturas (AJILOGBA e BABALOLA, 2013) e, principalmente, uso de cultivares resistentes (CARVALHO et al., 2005). No entanto, para eficiência destas medidas, a(s) cultivar(es) plantada(s) deve(m) ser resistente(s) à(s) raça(s) presentes na região. Até hoje, já foram identificadas três raças fisiológicas de FOL, raças 1, 2 e 3 (GONZALEZ-CENDALES

et al., 2016). As raças 1 e 2 são de ocorrência generalizada em campos de produção de tomateiro no Brasil enquanto a raça 3 tem ocorrência mais restrita. Esta, porém foi relatada em plantios comerciais no Estado do Rio de Janeiro, em lavouras de São José de Ubá e de Itaocara, regiões estas próximas a Nova Friburgo, por Reis e Boiteux (2007). No levantamento feito na microbacia de Barracão dos Mendes, Nova Friburgo em 2015, identificou-se como sendo da raça 3, 100% dos isolados coletados (Capítulo 1). Identificou-se, ainda que a maioria das cultivares plantadas na safra de 2015 nesta região eram resistentes apenas às raças 1 e 2 do patógeno (Capítulo 2). Nestes mesmos levantamentos, constatou-se ainda possíveis falhas no manejo do solo e da cultura que possam estar contribuindo para a disseminação e agravamento das perdas causada pela murcha-de-fusário na região.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo fazer um levantamento das práticas de manejo adotadas na cultura do tomateiro em Nova Friburgo, RJ, identificar a relação destas com o desenvolvimento das plantas e ocorrência de murcha-de-fusário e a relação entre a severidade da doença e atributos químicos e físicos do solo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido em propriedades agrícolas familiares no município de Nova Friburgo, região Serrana do Estado do Rio de Janeiro. A área amostrada compreende as comunidades de produtores familiares Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, localizada na microbacia de Barracão dos Mendes (22° 17' 14''S e -42° 32' 01''W). O levantamento foi realizado no período de janeiro a março de 2015 (Figura 9).



Figura 9. Unidades agrícolas familiares produtoras de tomate em Nova Friburgo, RJ.

2.1 Levantamento do Manejo Adotado na Região

Efetou-se, inicialmente, um levantamento sobre o histórico e as práticas de manejo e cuidados adotados em 40 unidades produtivas, como: tempo de cultivo de tomate na área (anos); último plantio de solanácea na área (anos); cultivo anterior ao tomateiro; histórico de murcha na área; tipo de solanácea no talhão; preparo do solo e práticas de conservação adotadas; implementos utilizados no preparo do solo; limpeza prévia do equipamento; origem da água de irrigação; tipo de irrigação utilizada; tipo de bandeja e substrato utilizado para a produção de mudas; local de produção de mudas; manejo dos resíduos da cultura no campo; suporte (bambu) para condução das plantas; tempo de realização da calagem (anos); análise do solo; assistência técnica; cama de aves; adubação verde e; cultivares utilizadas.

Além deste levantamento, coletaram-se, em cada uma das 40 propriedades, cerca de seis amostras de solo e plantas de tomateiro, três com sintomas de murcha e três assintomáticas.

Cada planta foi identificada e etiquetada e, em seguida, segmentada em seus diferentes órgãos - folhas, inflorescência, frutos, hastes e raiz. Determinou-se a massa fresca de cada uma destas frações. Em seguida, seccionaram-se as hastes de cada planta para observação do sistema vascular e mediu-se a extensão das áreas de xilema com necrose e da altura total. Em seguida, efetuou-se isolamento em cultura pura a partir de fragmentos do xilema de todas as plantas seguido de inoculação em mudas da variedade Perinha Água Branca para confirmação da diagnose e do agente causal (DHINGRA e SINCLAIR, 1995). Com os dados de extensão do xilema necrosado e do total da haste, calculou-se a severidade da doença pela porcentagem de infecção do sistema vascular.

Os isolados obtidos foram preservados em óleo mineral e inoculados em série diferenciadora e confirmados como sendo da raça 3 (Capítulo 1). As cultivares mais plantadas na região foram inoculadas com um isolado da raça 3 e avaliadas quanto à suscetibilidade a

esta raça (Capítulo 2), determinada com base na porcentagem de infecção do sistema vascular (I%).

Os dados qualitativos relativos ao levantamento sobre o histórico e manejo das diferentes unidades foram analisados com o cálculo da distribuição de frequências (absoluta (fa), frequência relativa (fr) e frequência percentual (fp) e com estatística descritiva por meio do programa Excel 2007. A construção dos gráficos foi realizada no programa SigmaPlot versão 10.0 (2006).

2.2 Amostras de Solo e Planta

Coletaram-se as amostras de solo na região de desenvolvimento das raízes das respectivas plantas. Estas amostras foram submetidas a análises físicas e químicas. Para tanto, secaram-se as respectivas amostras à sombra e posteriormente em estufa com circulação forçada (40°C), seguido de destorroamento e peneiramento em peneiras com malha de 2 mm. As amostras de ‘terra fina seca ao ar’ (TFSA) foram identificadas e armazenadas para posterior determinação analítica de: textura, pH, carbono orgânico e para extração e determinação de macro e micronutrientes (FREIRE et al., 2013).

A análise da fertilidade do solo foi realizada conforme Donagema et al. (2011) para: pH em água, Ca, Mg, K e Al^{+3} , P assimilável, potencial de acidez (H+Al), saturação de bases (V%), capacidade de troca catiônica (CTC) e carbono orgânico. Determinou-se, ainda, os valores pseudototais de Mn, Cu e Zn, segundo metodologia da EPA 3050B (USEPA, 1996). Para tanto, 1g de amostra de terra foi misturada a 10 mL de HNO_3 concentrado e digeridos em bloco digestor por 15 minutos a $95^\circ C \pm 5$. Em seguida, foram adicionados mais 5 mL de HNO_3 concentrado e aquecidos mais 2 horas na mesma temperatura. Finalizada essa etapa foram adicionados 2,0 mL de água destilada e 3,0 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Com o fim da efervescência foram adicionados mais 8 mL de H_2O_2 obtendo-se volume final de 8 mL. As soluções foram mantidas mais 2 horas em bloco digestor e ao final desse período foram adicionados 10,0 mL de HCl concentrado. Os extratos em temperatura ambiente foram transferidos para balões volumétricos de 50 mL e avolumados com água destilada, seguido de lenta filtração e armazenamento em tubos falcons. A qualidade das análises das amostras foi avaliada utilizando-se amostra SRM 2709 “San Joaquin Soil” (Baseline trace element concentrations), certificada pelo National Institute of Standards and Technology.

Para as amostras de plantas foram medidos os pesos frescos dos diferentes órgãos (Folha, Caule e Raiz) e em seguida seco em estufa de ar forçado a $60^\circ C$ até peso constante. As partes secas foram moídas em moinho (modelo IKA A-11), e porções de 1,0 g foram tiradas para determinar o teor de Ca, Mg, K, P, Al, Mn, Zn e Cu de cada órgão de cada planta. As concentrações dos elementos foram determinadas utilizando-se de metodologia segundo EPA 3050 citada por USEPA (2008). As amostras foram digeridas em bloco digestor por 15 minutos a temperatura de $95 \pm 5^\circ C$. A mistura consistiu de 1g da amostra adicionados 10 mL de HNO_3 concentrado. Posteriormente, a solução foi adicionada mais 5 mL de HNO_3 concentrado e levado ao bloco digestor por período de 2 horas na mesma temperatura. Após esse período, foram adicionadas 2,0 mL de água destilada e 8 mL de peróxido de hidrogênio. Finalizada a efervescência a solução foi avolumada para 50 mL adicionando-se água destilada, filtrados e armazenados em tubos falcons para posterior determinação dos elementos. A qualidade das amostras foi realizada utilizando-se amostra certificada 1573a *Tomato Leaves* (certificada pelo National Institute of Standards and Technology, NIST, 1995), e calculada a sua recuperação para metais. As concentrações de metais foram determinadas no Laboratório de Análises Químicas do Departamento de Solos da UFRRJ por Espectrofotometria de Absorção Atômica (EAA) com o equipamento marca Varian, modelo

606. Para a determinação do nitrogênio total de amostras de folhas e caule estas foram submetidas a digestão sulfúrica e posterior destilação (TEDESCO, 1983).

Com os dados quantitativos efetuou-se análise de componentes principal (ACP). Nesta, associou-se a porcentagem de infecção do sistema vascular por FOL (Inf) com os dados de declividade do terreno, de fertilidade do solo (pH, N, P, K, Ca, Mg, K e Al), e com teores de matéria orgânica (MO) e areia (Are). Dados de infecção foram também confrontados com os dados de acúmulo de macronutrientes (Ca, Mg, K e P) na planta e micronutrientes (Cu, Mn e Zn) na folha, caule e raiz e de Al na planta.

Para avaliar as relações entre infecção, desenvolvimento das plantas e atributos do solo a análise de componentes principais (ACP) foi realizada usando a função prcomp do software R (R Core Team, versão 3.2). A correlação de Pearson entre as variáveis de resposta foi medida antes da realização da ACP. Para minimizar o efeito de autocorrelação, as variáveis altamente correlacionadas foram removidas da análise. Dentre as variáveis com autocorrelação, foram selecionadas aquelas que apresentaram maiores coeficientes de correlação com variáveis relacionadas à infecção causada por FOL.

Análise de agrupamento foi realizada para identificar amostras com características semelhantes. Para isso, um dendograma foi construído tendo por base valores de pH, Ca, Mg, K, Al, Capacidade de troca catiônica (CTC), matéria orgânica (MO) e argila das 241 amostras.

Análise descritiva dos dados foi feita para a porcentagem de infecção por FOL (Inf.), idade da planta, suscetibilidade das cultivares (Capítulo 2), índice de fluxo de drenagem (TWI), declividade, altitude, dados de fertilidade do solo (Al total (AlT), Mn total (MnT), Fe total (FeT), P, MO, pH, CTC, soma de bases (S), Al^{+3} , $H+Al$, K, Mg e Ca, além de teores de silte, areia, argila. Análise descritiva também foi feita para dados referentes ao desenvolvimento das plantas (massa seca de folha (MSFolha), de caule (MSCaule) e de raiz (MSRaiz), massa fresca de folha (MFFolha), de caule (MFCaule) e de raiz (MFRaiz) e para os dados referentes ao acúmulo de N, Al, Ca, Mg, K, P, Zn, Mn e Cu nos diferentes órgãos da planta, folha, caule e raiz.

A distância euclidiana foi usada como uma medida de similaridade, enquanto o método hierárquico de Ward foi usado como um algoritmo de agrupamento. Isto minimizou a soma de quadrados (SQ) dentro dos grupos de tal forma que os grupos mais homogêneos foram formados em cada fase de agrupamento (HAIR et al., 2005). Para a definição do número de grupos formados, foi adotada como ponto de corte no dendograma a distância de ligação de 0,016. Este valor representa 1,25 vezes o desvio padrão da distância de ligação de todas as observações (MILLIGAN e COOPER, 1985). O resultado proveniente do agrupamento foi submetido à Validação Cruzada na Análise Discriminante, para avaliar a taxa de erro geral da distribuição das amostras nos grupos.

Os dados foram submetidos à análise multivariada dos principais componentes, agrupamento e validação cruzada na análise discriminante utilizando o software R (R Core Team, versão 3.2) e análise descritiva usando o Microsoft® Office Excel®.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Manejo da Cultura do Tomateiro e sua Associação com a Murcha-de-Fusário

A região estudada é composta basicamente por produtores familiares que tem sua renda baseada na produção de hortaliças, principalmente couve-flor e tomate. As áreas amostradas são regularmente utilizadas para plantio de tomateiro, sendo o seu cultivo feito há mais de 20 anos em mais de 42,5% destas áreas, observando-se na maioria das vezes um intervalo de um, dois ou mais anos entre um ciclo e outro (Figura 10A e Figura 10B). No ano em que foi realizada esta pesquisa (2015), 18% dos produtores confirmaram realizar o plantio de solanácea anualmente no mesmo local, enquanto que 30% dos produtores fazem intervalo de dois anos e, 30% de mais de dois anos. Apenas 3% dos produtores nunca haviam utilizado o local para plantio de solanácea e 20% não informaram (Figura 10B). A principal cultura em alternância ao tomateiro é a de couve-flor, 56% dos entrevistados, (Figura 10C), o que confirma a importância destas duas culturas na região.

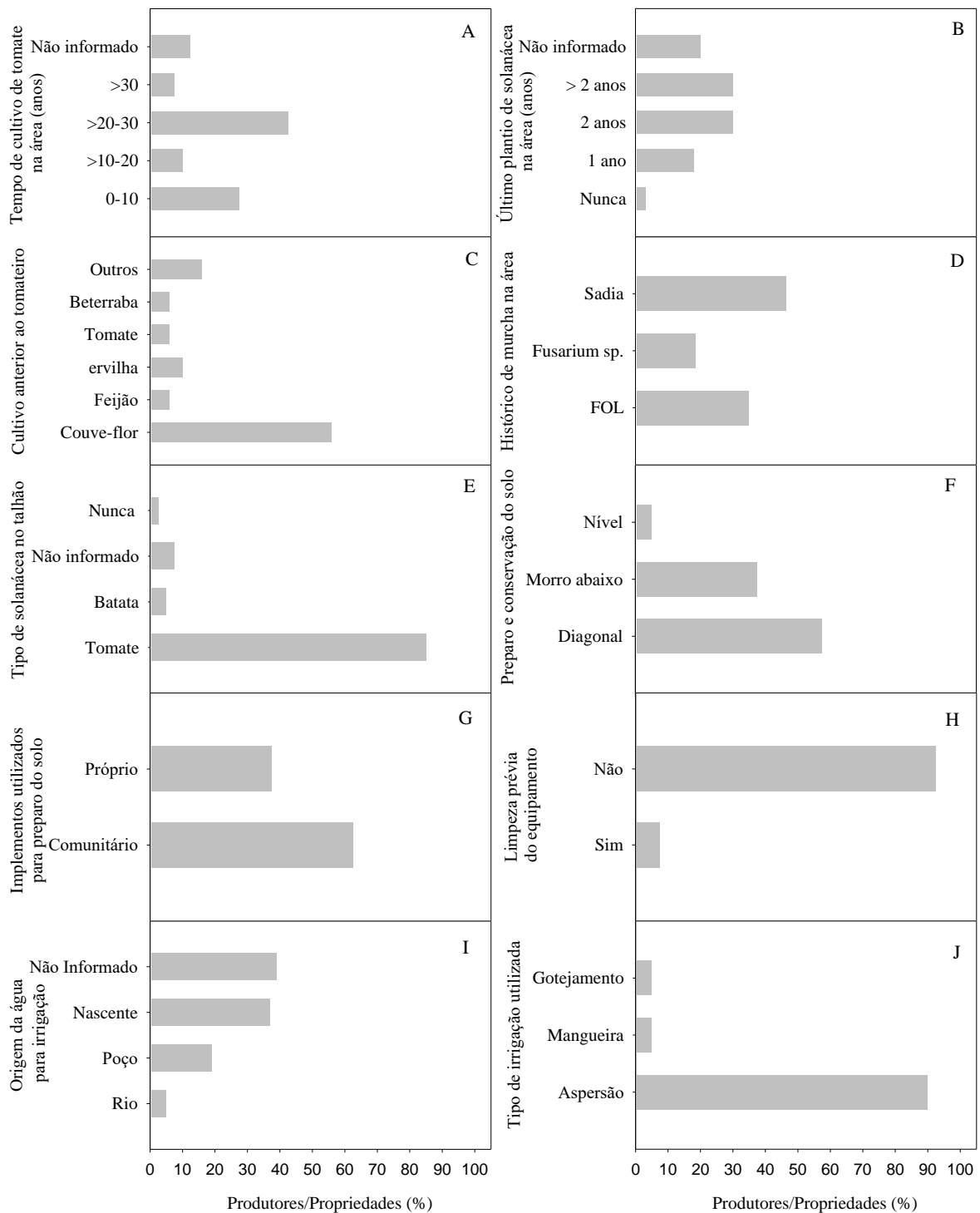


Figura 10. Levantamento das unidades agrícolas em Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, Nova Friburgo, RJ, quanto ao histórico de uso da área e práticas de manejo adotadas na cultura do tomateiro no ano de 2015.

Este longo histórico de cultivo e especialização na cultura explica a alta frequência de lavouras com doenças causadas por patógenos de solo, cerca de 53%, sendo que 35% destas com diagnóstico positivo para murcha-de-fusário, causada por FOL, e 18% não confirmados,

porém identificados como sendo *Fusarium* sp. (Figura 10D, Figura anexo 3 e Figura anexo 4).

Dentre as solanáceas utilizadas na região o tomate tem destaque, 85%, enquanto que a batata é plantada por somente 5% dos produtores (Figura 10E). A rotação de culturas, ou o pousio, é prática pouco frequente na região. Geralmente as áreas estão sempre em cultivo, na maioria das vezes, intercalando o tomate no verão e outra cultura no inverno, aproveitando as covas e resíduos da adubação do tomateiro confirmando os relatos de GRISEL e ASSIS (2015). Entre as culturas intercaladas com tomate estão couve-flor, 56%, ervilha, 10%, feijão de vara, 6% e beterraba 6% ou até mesmo o plantio subsequente de tomate, 6% (Figura 10C). Recomenda-se um intervalo de pelo menos três anos entre um ciclo e outro do tomateiro em uma mesma área (FILGUEIRA, 2008). Contudo segundo Molher e Johnson (2009) este intervalo deve ser igual ou superior a 5/7 anos e, em casos de alta incidência de murcha-de-fusário, mais que sete anos. A rotação de culturas pode contribuir para eliminar ou reduzir a densidade de inoculo de patógenos no solo e favorecer a sua supressividade pelo aumento de microrganismos antagonistas (REIS et al., 2011). Contudo, para FOL esta medida pode ser pouco eficiente por apenas reduzir a quantidade de inóculo e não eliminá-lo devido à sua sobrevivência na forma saprofítica ou de clamidósporos (NESHEV, 2008; MCGOVERN, 2015).

Apesar da pouca eficiência da rotação de cultura no controle de doenças causadas por patógenos de solo (NESHEV, 2008), esta prática é recomendada para o controle destas, mas com resultados variáveis. Liu et al. (2013), conduziram rotação de tomate com cebola obtendo o crescimento do tomate e conseqüente aumento de produtividade e reduziram a ocorrência da doença, murcha-de-fusário, devido a produção de substâncias alopáticas exudadas pelas raízes das cebolas. Produtores de tomate na Bahia utilizam o cultivo rotacionado para o controle de *Fusarium*, mas não têm obtido sucesso (GUIMARÃES et al., 2015). Por fim, muitos agricultores tentam solucionar o problema cultivando culturas não suscetíveis em locais onde o solo se encontra altamente contaminado (SMITH, 2007).

Além do longo histórico de cultivo de tomateiro na região, observa-se ainda outros aspectos que podem estar contribuindo para ampla disseminação da doença como: preparo do solo morro abaixo (37,5% dos casos) ou em diagonal (57,5%) à declividade do terreno (Figura 10F) facilitando o arraste de solo pela erosão, uso de máquinas e implementos comunitários (62,5%) (Figura 10G) e a não limpeza prévia destes (92,5%) ao migrarem de uma área para a outra (Figura 10H). A não observação de princípios básicos de conservação de solo, aliada à topografia declivosa e áreas sem cobertura vegetal, verificada na região, favorecem a erosão hídrica e o arraste de sedimentos e, que afetam negativamente a fertilidade do solo com aumento da acidez e do Al tóxico (PEREIRA, 2008). Este processo erosivo facilita também o transporte de estruturas do patógeno, seja nos resíduos culturais ou na forma de clamidósporos, tanto no escoamento superficial da água e arraste de solo pela erosão como no solo aderido aos pneus e discos de tratores e implementos (AJILOGBA e BABALOLA, 2013). Parte do solo contaminado pode ser ainda transportado para os cursos hídricos e poços usados para captação da água permitindo o transporte de inóculo via água de irrigação e a contaminação das áreas. Conforme observado, 5% e 19% dos produtores irrigam suas lavouras utilizando água do rio ou de poços, enquanto 37% usam água de nascente (Figura 10I). A irrigação por aspersão é praticamente generalizada, em mais de 90% das propriedades e apenas 5% por gotejamento e 5% com uso de mangueiras (Figura 10J). O manejo da irrigação pode contribuir para o controle de murcha-de-fusário. Redução no fornecimento de água na fase inicial do ciclo da cultura pode estimular o desenvolvimento radicular e, ao mesmo tempo, reduzir o processo de infecção. Maior disponibilidade de água, 50 dias após o transplantio por sua vez, pode compensar o estresse hídrico da planta provocado pela infecção resultando em melhores produções (LAPIDUZ, 2013).

A sobrevivência do patógeno nas áreas é facilitada pelo cultivo regular do tomateiro há vários anos (Figura 10A), mesmo que observando intervalos de um a dois anos entre os cultivos em uma mesma área (Figura 10B). Sabe-se que FOL pode sobreviver de forma saprofítica em restos de cultura e no solo na forma de clamidósporos por 7 ou mais anos (GONÇALVES, 2015) e que para controle da doença são recomendados períodos de rotação por mais de 5 anos (MOHLER e JOHNSON, 2009). Outro fator relevante é a origem das mudas. As mudas são, predominantemente, produzidas em bandejas de isopor (82,5%), em detrimento das de plástico (17,5%), por viveiristas da região (62,5%) contra apenas 37,5% feita pelos próprios produtores (Figura 11A e Figura 11B), em todos os casos utilizando-se substrato comercial. Ainda, apesar de não quantificado, observa-se como prática comum a deposição das bandejas com mudas sobre o solo às margens da área por alguns dias até serem transplantadas. Esta prática pode facilitar a infecção precoce das mudas bem como facilitar a contaminação das bandejas, especialmente as de isopor que são de mais difícil higienização. Ainda, o reuso destas bandejas sem sanitização, pode ser mais uma forma de contaminação das lavouras.

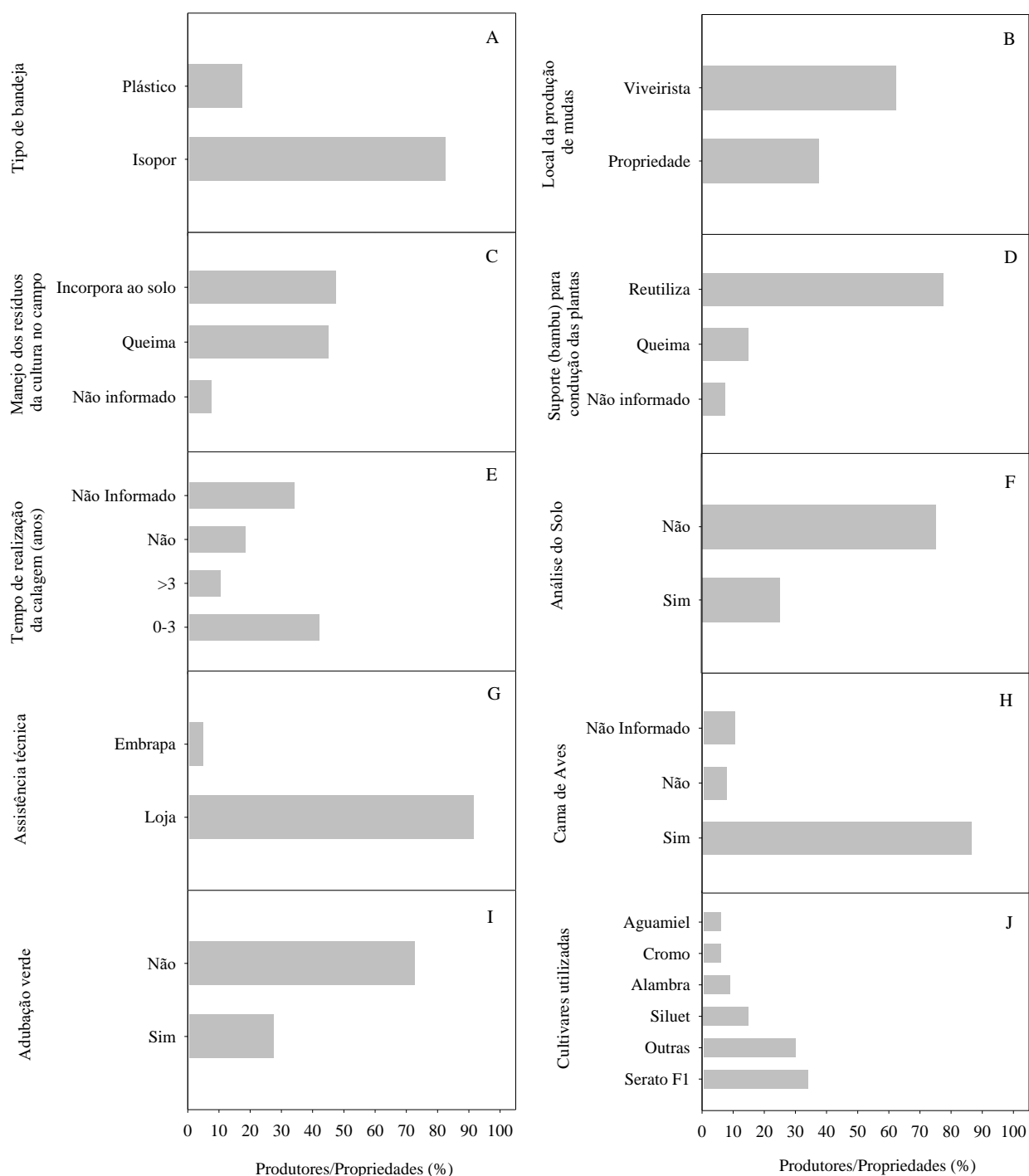


Figura 11. Levantamento das unidades agrícolas em Serra Nova, Serra Velha e Rio Grande, Nova Friburgo, RJ, quanto ao histórico de uso da área e práticas de manejo adotadas na cultura do tomateiro no ano de 2015.

Observa-se, ainda, que em 47,5% das vezes os restos culturais são incorporados ao solo, enquanto que 45% informaram que os queimam (Figura 11C). A condução das plantas em varas de bambu é feita pela grande maioria dos produtores e que estes em 77,5% dos casos as reutilizam em novos plantios (Figura 11D). A remoção e destruição de plantas e varas no

final do ciclo são de grande importância para o manejo de doenças uma vez que o patógeno pode sobreviver nos restos da cultura e nas estacas utilizadas para a condução (MCGOVERN, 2015). A remoção ou queima dos resíduos culturais e sanitização de materiais reutilizáveis antes do seu reuso é estratégia importante para se evitar a sobrevivência e dispersão do patógeno ou disseminação para novas plantas ou para o próximo ciclo da cultura (AJILOGBA e BABALOLA, 2013).

A acidez do solo ($\text{pH} < 6,5$) (PEREIRA e PINHEIRO, 2014; MCGOVERN, 2015) é também citada como fator favorável ao desenvolvimento da doença. Acidez esta que é favorecida pela erosão dos solos locais decorrente da forma inadequada de preparo do solo (Figura 10F) e pela dificuldade em se fazer a aplicação e incorporação de corretivos devido à acentuada declividade dos terrenos. A realização da calagem foi citada pelos produtores, sendo que 40% destes a fizeram nos últimos três anos, 10% a fizeram há mais de três anos enquanto 17,5% não realizaram ou não souberam informar (32,5%) (Figura 11E). Ainda, apesar de cerca de 50% dos produtores informarem ter feito calagem, o fizeram sem critérios técnicos para cálculo da quantidade visto não terem como rotina a análise de fertilidade do solo (75%) (Figura 11F). Apesar de não quantificado, houve relatos de aplicação de corretivos nas covas por ocasião do transplante. Constata-se com estas informações que, apesar dos altos investimentos em insumos pelos produtores nas lavouras de tomate, especialmente sementes, adubos químicos e agrotóxicos, negligenciam na correção de acidez, mesmo sendo a calagem de custo relativamente baixo. Este resultado deve-se, provavelmente, ao não acesso de assistência técnica oficial. Esta é essencialmente feita nos balcões das lojas de produtos agropecuários (95%) contrapondo a uma minoria que relatou receber assistência técnica da Embrapa (5%) (Figura 11G). A realização de calagens é importante para o tomateiro por corrigir a acidez e neutralizar o Al tóxico e, conseqüentemente, estimular a atividade microbiana e aumentar a disponibilidade dos demais nutrientes para as plantas (FREIRE et al., 2013). Está prática é importante para auxiliar no controle da murcha-de-fusário uma vez que a doença é estimulada por baixo pH (GATCH e DU TOIT, 2017) e baixa concentração de cálcio na planta (MARSCHNER, 2012). Fang et al. (2012), demonstraram que em pH do solo 6,7 plantas de morango exibem menor severidade de murcha-de-fusário quando comparado a solos mais ácidos, pH 5,2 ou 5,8. Pereira e Pinheiro (2014) citam pH entre 6,5 a 6,8 para o controle da murcha-de-fusário em tomateiros.

Outra prática de manejo que pode interferir na murcha-de-fusário é a adição de matéria orgânica. Cerca de 82,5% dos produtores fazem aplicação de 30 a 1500 g de cama de ave nas covas e cerca de 27,5% fazem pré-cultivo e incorporação de resíduos de aveia preta, milho ou amendoim forrageiro (Figura 11H e Figura 11I). Há dificuldade na introdução dessa prática no local devido a prioridade em se ocupar as áreas de produção com hortaliças mais produtivas. Trabalhos têm sido desenvolvidos na região com o intuito de demonstrar a importância da prática na melhoria das condições do solo com o cultivo de plantas de cobertura como aveia preta no inverno (GRISEL e ASSIS, 2012) e leguminosas no verão (BARROS et al., 2009).

No entanto, a estratégia mais eficiente para controle da murcha-de-fusário do tomateiro é o uso de cultivares resistentes. Está eficiência, porém, depende da escolha correta da cultivar em função da distribuição e ocorrência das raças do patógeno na área/região. Nas 40 lavouras investigadas, identificou-se a utilização de 15 cultivares com predomínio de Serato F₁ (34%), Siluete (15%), Alambra (9%), Cromo (6%) e Aguamiel (6%) (Figura 11J). Outras cultivares plantadas, que correspondem a 30%, foram Lumi, Itaipava F₁, Natália e Paron, com cerca de 4% cada, Diana, Pizzadoro, Giuliana, Caeté, Juliet F₁ e Débora, com cerca de 2% cada. Todas estas cultivares, exceto Giuliana e Juliet são citadas como resistentes às raças 1 e 2 de FOL pelas respectivas empresas que as comercializam. As cultivares Aguamiel e Cromo são citadas como resistentes às raças 1, 2 e 3. Estas informações foram

checadas em teste de inoculação com as respectivas raças (Capítulo 2) e confirmado a resistência para as raças 1 e 2 em Cromo, Forty, Ivety, Lumi, Natália e Serato F₁. As cultivares Débora e Itaipava F₁, porém comportaram-se como AR a raça 2.

O plantio na região feito predominantemente com cultivares resistentes às raças 1 e 2 explicam a ocorrência generalizada da raça 3 de FOL (Capítulo 1). E, o predomínio desta raça explica as falhas no controle com o uso destas cultivares. Somente em plantas das cultivares Diana, Itaipava F₁, Pizzadoro, Caeté, Paron, Aguamiel e Débora (resistente às raças 1 e 2) não foram identificadas plantas com murcha-de-fusário (Capítulo 1).

Com base nestas informações pode-se especular que as perdas pela doença somente não são maiores por serem a maioria das cultivares plantadas resistentes às raças 1 e 2 do patógeno, de ampla distribuição no Brasil (SOUZA et al., 2010).

Grande parte das cultivares de tomate para o mercado *in natura* e para industrialização são híbridos, geralmente selecionadas de acordo com as características físicas e químicas do fruto e que atendam as exigências do respectivo mercado além de tolerância e/ou resistência a algumas dessas doenças como murcha-de-fusário, murcha-de-verticílio, nematóide das galhas além de pinta-bacteriana e viroses como as causadas por tospovírus e geminivírus (SILVA et al., 2006). No caso da murcha-de-fusário, é fundamental que a resistência seja às três raças ou à(s) raça(s) presentes na região. Provavelmente, o uso contínuo de cultivares resistentes às raças 1 e 2 favoreceram a seleção e predomínio da raça 3 e, conseqüente quebra da resistência destas plantas (CASELA e FERREIRA, 2006).

Diante de medidas pouco eficazes no controle de FOL a adoção de métodos como o uso de cultivares resistentes se torna importante uma vez instalado o patógeno no solo. Todavia, quando o local se encontra livre da doença, medidas preventivas se tornam necessárias como uso de mudas e sementes sadias (PEREIRA e PINHEIRO, 2014). Estas são, provavelmente, os maiores responsáveis pela fácil e rápida disseminação e introdução de FOL em novas áreas de produção. A disseminação local no campo decorre do escoamento do solo pela erosão, revolvimento com máquinas e equipamentos e compartilhamento destes (MOLHER e JOHNSON 2009).

3.2 Relação entre Atributos do Solo e Desenvolvimento da Planta e da Murcha-de-Fusário

O sistema de manejo adotado na região favorece a degradação do solo pelos processos erosivos e, conseqüentemente, a redução de sua fertilidade, o que pode agravar as perdas pela murcha-de-fusário. As componentes (CP1 + CP2) explicam 40,5% da variação observada entre dados de declividade, Inf. e fertilidade (Figura 12A) e 54,5% da relação entre teor de areia, MO, CTC e Inf. (Figura 12B). Observou-se uma relação estreita e positiva entre declividade e teor de Al⁺³ no solo e Inf. e, negativa entre estes e a fertilidade do solo (teores de Ca, P, N e K) e, principalmente, entre estes e o pH (Figura 12A). Ou seja, em áreas de maior declividade têm-se maiores perdas de solo, possivelmente pela remoção das camadas superiores (mais férteis) pela erosão e exposição de camadas menos férteis e mais ácidas e com maiores teores de Al⁺³. Esta condição afeta negativamente tanto o desenvolvimento das plantas como favorecem o desenvolvimento da doença. Este efeito da qualidade do solo sobre a doença é confirmado na relação estreita e positiva entre teor de areia e infecção e da relação negativa entre estes e CTC e MO (Figura 12B). Estes resultados indicam que existe uma relação estreita entre a degradação do solo pela erosão, com acúmulo de areia e perda de argila das camadas mais férteis do solo com o aumento das perdas pela doença. Esta perda de fertilidade é tentativamente compensada com o alto aporte de fertilizantes (SOUZA, 2017), o que encarece o custo de produção e pode gerar desequilíbrios ambientais e nutricionais na

planta. Ainda, o manejo adotado gera índices negativos no solo como redução do pH, da capacidade de retenção de água, da MO e da atividade biológica. Estes fatores aliados podem contribuir para o agravamento das perdas por doenças (VAN BRUGGEN et al., 2015), dentre estas a murcha-de-fusário.

Estas perdas pela doença e pelas condições de fertilidade podem ser percebidas pela relação inversa entre porcentagem de infecção (Inf.) e acúmulo de nutrientes pelas plantas. Há uma relação direta e positiva entre porcentagem de infecção e acúmulo de Al, elemento tóxico, e inversa e negativa com o acúmulo de Ca e Mg (Figura 12C) (CP1 + CP2 = 64,5%).

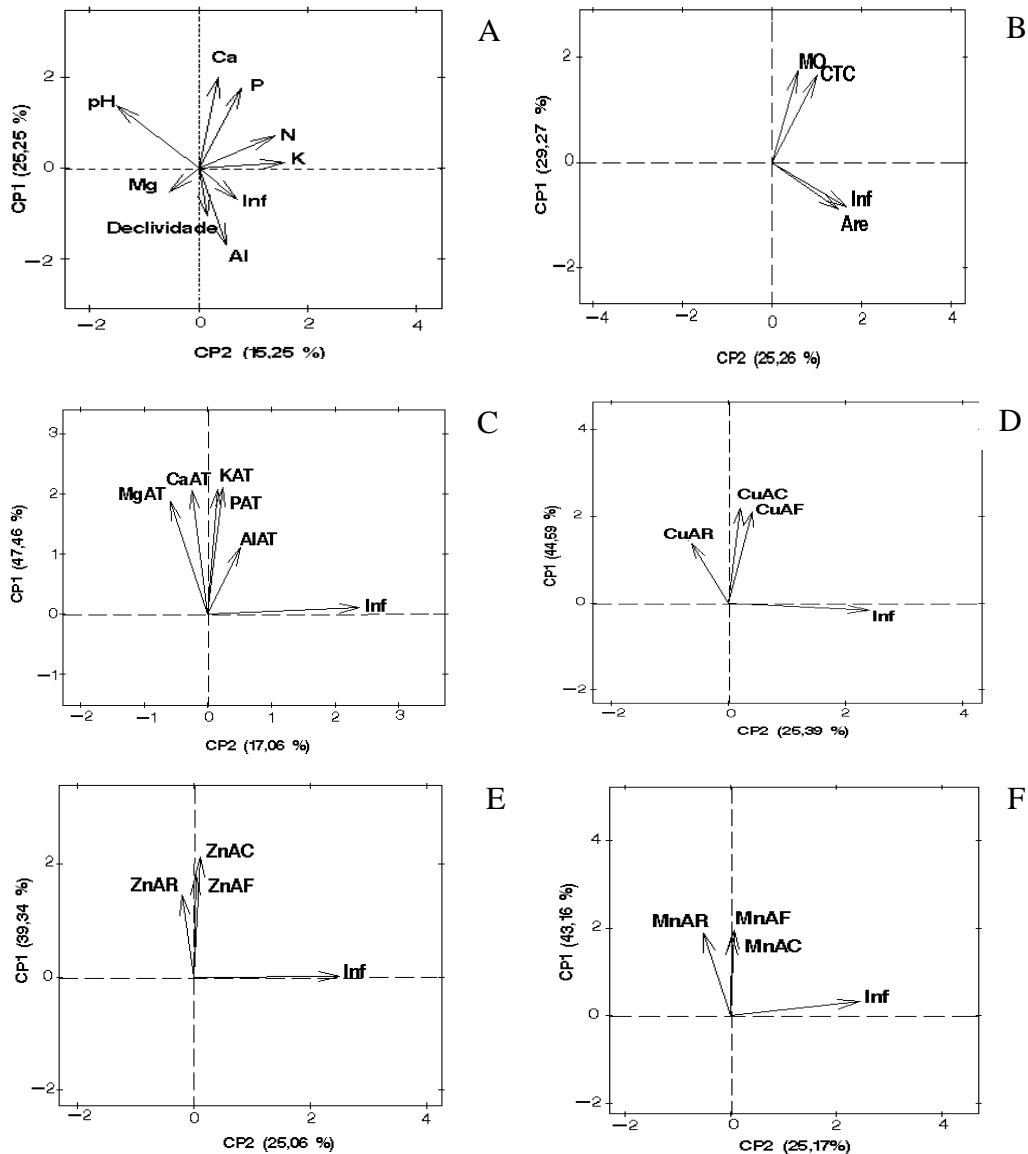


Figura 12. Análise de componente principal (ACP) referente aos dados de solo, desenvolvimento das plantas de tomateiro e infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A) Declividade e fertilidade x porcentagem de infecção; B) Teores de areia, matéria orgânica, CTC x porcentagem de infecção; C) acúmulo de nutrientes e de Al nas plantas x porcentagem de infecção; D, E e F) acúmulo de Cu, Zn e Mn nas folhas, caule e raiz, respectivamente x porcentagem de infecção (continua).

Figura 12. Continuação. **Legendas:** Inf. = porcentagem de infecção do sistema vascular por FOL; Declividade do local; N, P, K, Mg, Ca, Al (alumínio trocável), pH (pH em água); Are = teor de areia; Matéria orgânica = MO; CTC = capacidade de troca catiônica; PAT = fósforo acumulado total; KAT = potássio acumulado total; CaAT = cálcio acumulado total; MgAT = magnésio acumulado total; AlT = alumínio acumulado total; CuAR = cobre acumulado na raiz; CuAC = cobre acumulado no caule; CuAF = cobre acumulado na folha; ZnAR = zinco acumulado na raiz; ZnAC = zinco acumulado no caule; ZnAF = zinco acumulado na folha; MnAR = manganês acumulado na raiz; MnAC = manganês acumulado no caule e; MnAR = manganês acumulado na raiz.

Sabe-se que a infecção por FOL bloqueia os vasos condutores da planta, impedindo a passagem de água e nutrientes resultando em menor desenvolvimento das plantas (DI et al., 2016). Este bloqueio ocorre devido ao crescimento do patógeno nos vasos do xilema resultando no atrofiamento das plantas, descoloração dos vasos condutores, amarelecimento e murcha das folhas iniciando-se pelas baixas, e posteriormente das mais velhas (AJILOGBA e BABALOLA, 2013).

Resultado condizente com o encontrado por Van Bruggen et al. (2015) que correlacionaram a baixa incidência de *F. oxysporum* f. sp. *lini* em plantas de linho com alto conteúdo de MO, N e C no solo. Diferente desse trabalho Yergeau et al. (2010) encontraram maior correlação entre a abundância de *Fusarium* sp. no solo com o conteúdo de matéria orgânica e teor de argila. Contudo, os autores não relacionaram a abundância do fungo no solo com a ocorrência de doença de plantas.

A textura arenosa do solo geralmente contribui para a severidade de murcha-de-fusário (AMIR e ALABOUVETTE, 1993; AGRIOS, 2005), provavelmente por serem estes caracterizados pela baixa fertilidade e reduzida CTC (RAIJ, 1991) e baixa retenção de água o que tornam as plantas mais vulneráveis aos danos causados pelo patógeno (MASCHENER, 2012). Na contramão, a matéria orgânica do solo é reconhecida como o elemento chave na qualidade física, química e biológica do solo e no crescimento e desenvolvimento das plantas. Exerce efeito sobre a fertilidade do solo fornecendo nutrientes a plantas, contribui para a CTC, possui resistência as modificações de pH do solo, boa capacidade de infiltração e retenção de água, participa na estabilidade de agregados e redução da atividade do Al^{+3} na solução do solo entre outros benefícios (MEURER, 2010).

Sabe-se, ainda, que o desenvolvimento da murcha-de-fusário é favorecido por solos ácidos ($pH < 6,5$) (PEREIRA e PINHEIRO, 2014), além do possível agravamento das perdas pela redução da disponibilidade de nutrientes para as plantas sob condição de acidez e ao efeito da nutrição das plantas sobre resistência. Além disso, a doença pode estar relacionada a menor disponibilidade dos macronutrientes e micronutrientes no solo sob condições de baixo pH onde a disponibilidade dos nutrientes é reduzida (MEURER, 2010).

A topografia irregular da região aliada ao manejo adotado tende a favorecer os processos erosivos e a acidificação do solo. Além disso, a acentuada declividade onde a cultura do tomateiro é implantada propicia o arraste de sedimentos, por água da chuva ou de irrigação, que podem conter estruturas do patógeno contaminando outras áreas.

Dessa forma, o manejo da fertilidade do solo com a associação de práticas culturais é fundamental para o sucesso da cultura. Resultados positivos foram obtidos por Fang et al. (2012) com o controle do pH do solo, adição de matéria orgânica associado com rotação de cultura na redução da severidade da murcha-de-fusário em morangueiros.

Quando se avalia a relação entre infecção e o acúmulo dos micronutrientes Cu, Zn e Mn na folha, caule e raiz, verifica-se que as componentes principais (CP1 + CP2) acumulam 69,98%, 64,4% e 68,33% da variância nas análises para os respectivos nutrientes. Nota-se que

a porcentagem de infecção se relacionou negativamente com o acúmulo de Cu, Zn e Mn na folha, caule e principalmente raiz (Figura 12D Figura 12E e Figura 12F).

O tomateiro é uma cultura bastante exigente em nutrientes e a ordem preferencial de absorção dos elementos segue a seguinte ordem: N, K, Ca, S, P, Mg, Cu, Mn, Fe, e Zn (FAYAD et al., 2002). A absorção desses nutrientes pela planta dependerá da disponibilidade na solução do solo sendo este fator condicionado pela forma química que esse se encontra presente, da capacidade de absorção da cultura, do desenvolvimento do sistema radicular, do tempo de crescimento, condições climáticas e da disponibilidade dos outros nutrientes (RAIJ, 1991). Além disso, doenças em plantas podem reduzir a disponibilidade, entrada, distribuição ou utilização do nutriente e os sintomas da doença podem refletir no seu estado nutricional (MASCHENER, 2012).

Com base nos atributos dos solos, pH, Ca, Mg, K, Al, CTC, MO e argila foi construído um dendrograma. O número de grupos foi identificado através do ponto de corte a distância de ligação de 0,016, o que representa 1,25 vezes o desvio padrão da distância de ligação de todas as observações (MILLIGAN e COOPER, 1985) com a formação de 2 a 12 grupos. O resultado proveniente do agrupamento foi submetido à Validação Cruzada na Análise Discriminante, para avaliar a taxa de erro geral da distribuição das amostras nos grupos. A formação de 4 grupos foi a que apresentou menor taxa de erro geral (9,85%). No entanto, optou-se pela separação em dois grupos, por representar uma separação mais homogênea das amostras (Figura 13 e Tabela anexo 6), sendo o Grupo 1 (G1) e o Grupo 2 (G2) formados por 119 e 122 amostras, respectivamente.

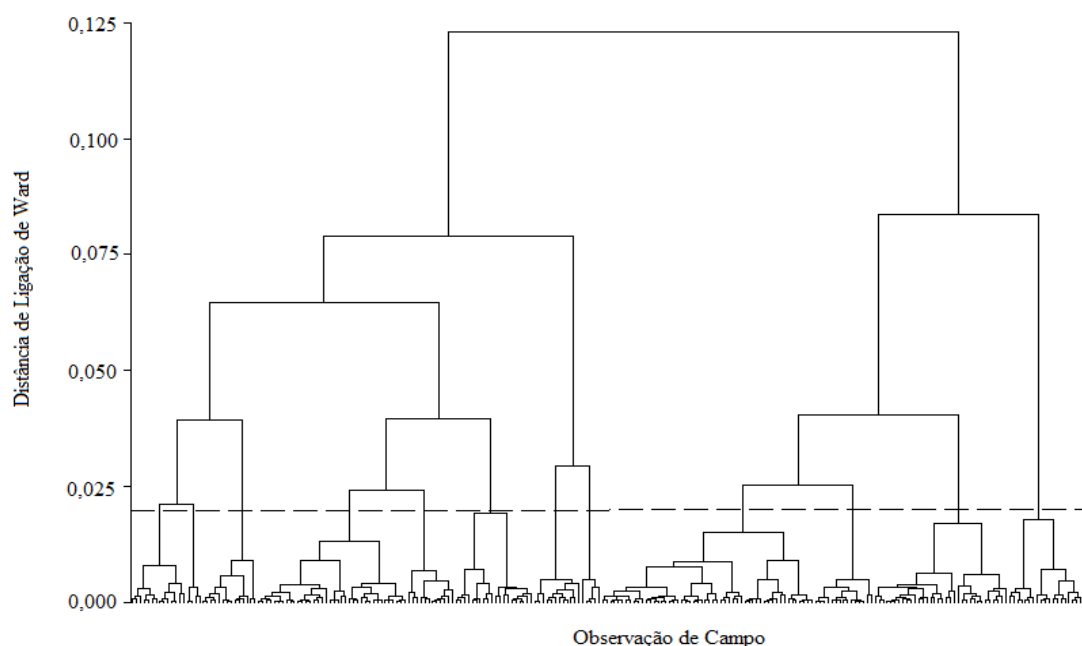


Figura 13. Dendrograma relacionado à análise de agrupamento a partir dos valores de pH, Ca, Mg, K, Al, capacidade de troca catiônica (CTC), matéria orgânica (MO) e argila das 241 amostras de solo coletadas em Nova Friburgo, RJ estabelecidas pelo método de Ward e distância Euclidiana.

O Grupo 1 é constituído por amostras de plantas de cultivares menos suscetíveis (Conforme Capítulo 2), mais jovens, mas principalmente por plantas com menores porcentagens de infecção pelo patógeno (Figura 14A).

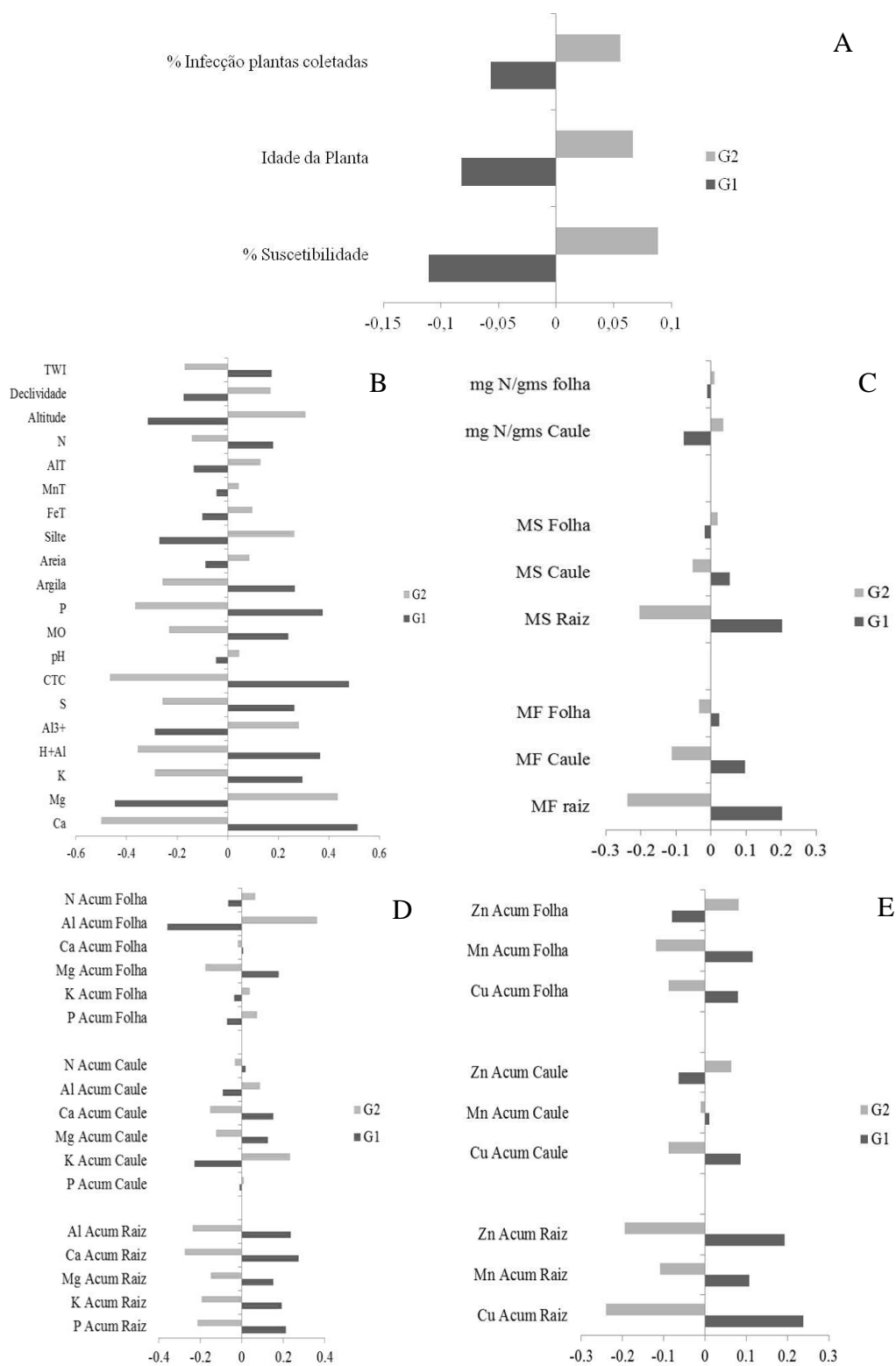


Figura 14. Média padronizada de: A) % de infecção das plantas coletadas, Idade da planta e % de suscetibilidade das cultivares comerciais utilizadas por produtores da região; B) Atributos do solo; C) Nitrogênio acumulado em folha e caule (mgN/gms); Massa seca de folha, caule e raiz e; massa fresca de folha, caule e raiz; D) Nitrogênio (N), Alumínio (Al), Cálcio (Ca); Magnésio (Mg), Potássio (K) e Fósforo (P) acumulado em folha, caule e raiz e; E) Zinco (Zn), Manganês (Mn), Cobre (Cu) acumulados em folha caule e raiz nos dois grupos (G1 e G2) formados através de análise de agrupamento.

O aparecimento de sintomas da murcha-de-fusário é relatado em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, contudo a severidade dos sintomas é mais intensa na fase de florescimento e frutificação da planta (AGRIOS, 2005). Fato este descrito por Webb et al. (2017), onde os autores relatam o aumento da severidade da doença com o avanço da idade da cultura.

As amostras do Grupo 1 estão localizadas, predominantemente, em áreas de menor declividade e são caracterizadas pelas melhores condições de fertilidade no que diz respeito aos teores médios de Ca, CTC, S, MO, Argila, N, P e K (Tabela 12 e Figura 14B) e também de plantas com maiores valores de acúmulo de massa seca e fresca no caule e raiz (Figura 14C).

Tabela 12. Média, desvio padrão (DP) e valores mínimos e máximos de atributos do solo nos dois grupos de plantas formados por análise de agrupamento, Grupo 1 e Grupo 2 (G1 e G2), das áreas amostradas para a influência sobre a murcha-de-fusário em tomateiro.

Grupo 1	pH	Ca	Mg	Al	CTC	MO	Argila
	pH água 1:2,5	cmolc dm ⁻³	cmolc dm ⁻³	cmolc dm ⁻³	cmolc dm ⁻³	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹
Média	5,54	3,24	0,62	0,06	11,78	21,60	377,02
DP	0,50	1,41	0,59	0,08	2,68	11,83	115,28
Mínimo	4,07	1,60	0,00	0,00	5,38	0,00	133,06
Máximo	6,52	10,50	2,80	0,40	19,29	64,38	794,74
Grupo 2	pH	Ca	Mg	Al	CTC	MO	Argila
	pH água 1:2,5	cmolc dm ⁻³	cmolc dm ⁻³	cmolc dm ⁻³	cmolc dm ⁻³	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹
Média	5,59	1,94	1,34	0,15	9,09	16,94	323,60
DP	0,51	0,72	0,85	0,20	2,35	6,84	79,03
Mínimo	4,11	0,00	0,00	0,00	3,85	0,00	137,97
Máximo	6,77	3,90	4,20	0,85	16,06	39,25	538,30

Neste mesmo Grupo 1, caracterizado pela menor porcentagem de infecção, têm-se maiores acúmulos de Mg, Mn e Cu nas folhas, de N, Ca, Mg, Mn e Cu no caule e de Al, Ca, Mg, K, P, Zn, Mn e Cu nas raízes (Figura 14D, Figura 14E e Figura 15).

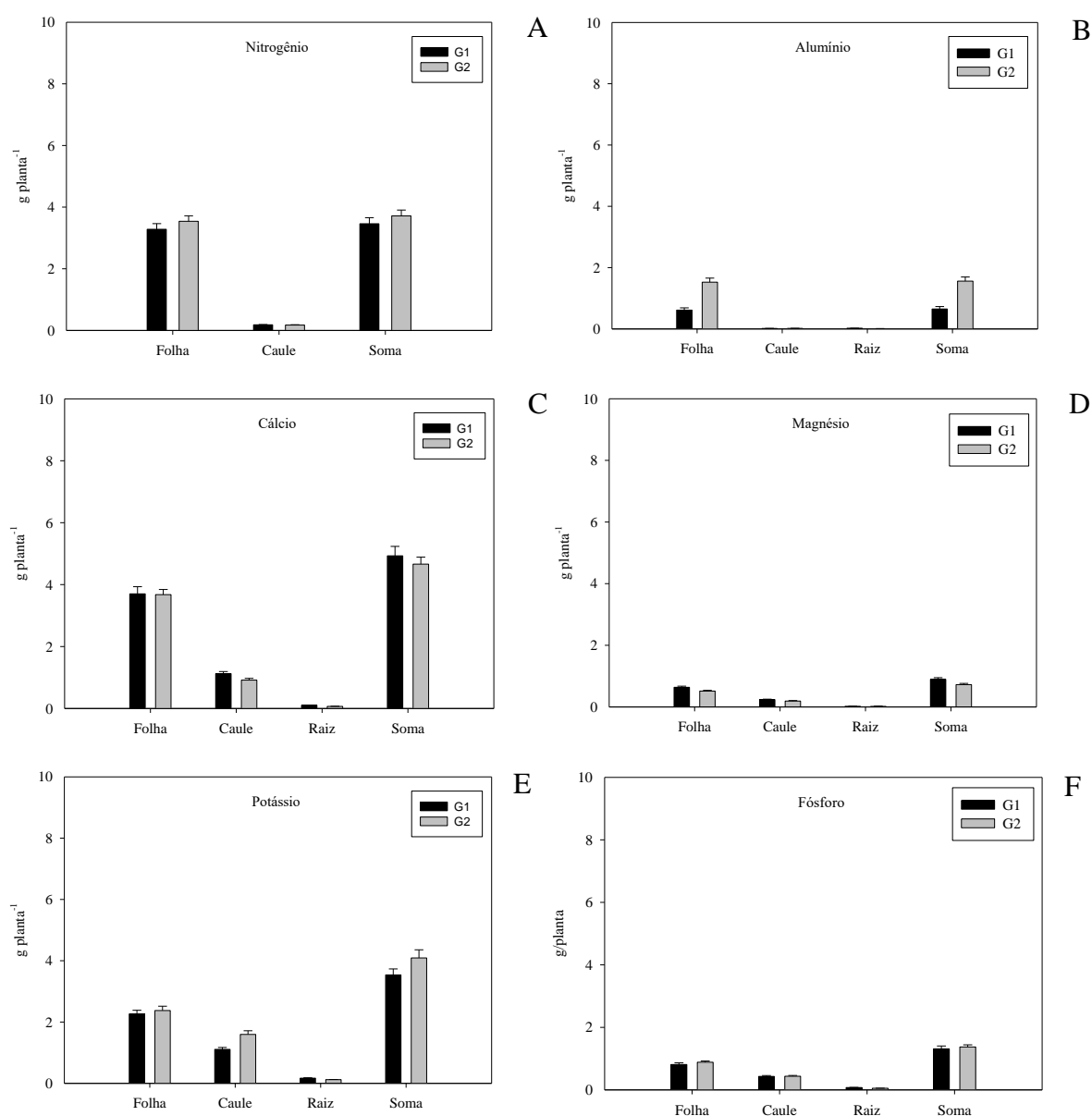


Figura 15. Quantidades médias de Nitrogênio (A); Alumínio (B); Cálcio (C); Magnésio (D) e; Fósforo (E) acumulados em folha, caule e raiz e soma destas nas plantas de tomateiro.

Por sua vez, as amostras do Grupo 2, caracterizado pela maior porcentagem de infecção (Figura 14A), estão localizadas em áreas de maior declividade e apresentam menor fertilidade, caracterizada pelos menores valores de Ca, K, P e N, além de menor S, CTC, MO, e argila e maiores valores médios de Mn, Fe, Mg, Al³⁺, silte e areia (Tabela 12 e Figura 14B). Este mesmo Grupo 2, caracterizou-se pelo menor desenvolvimento das plantas expresso pela menor massa seca e fresca de caule e raiz (Figura 14C). Quanto ao acúmulo de nutrientes, em partes da planta, maiores valores de N, Al, K, P e Zn foram observados em folhas comparados aos outros órgãos. No caule maiores valores de Al, K e Zn. E na raiz todos os elementos apresentaram níveis baixos (Figura 14D, Figura 14E e Figura 15).

Os valores médios de pH variaram pouco de um grupo para outro, contudo os valores de pH registrados na região (G1 e G2) se encontravam na faixa de 4,07 a 6,77 (Tabela 12), sendo considerado extremamente ácido (<4,4) a neutro (6,6 a 7,3), respectivamente (FREIRE et al., 2013). Para o controle da murcha-de-fusário o pH adequado do solo deve estar na faixa

de neutralidade 6,5 a 6,8 (PEREIRA e PINHEIRO, 2014) ou 6,5 a 7,0 (GULLINO et al., 2015).

Embora os dados coletados não permitam uma análise mais precisa e separação de efeitos, pode-se inferir que a maior porcentagem de infecção e menor desenvolvimento das plantas estão relacionadas a maior declividade, associado ao manejo inadequado do solo, resultando em piores condições de fertilidade dos solos nas amostras do Grupo 2 comparadas às do Grupo 1. No Grupo 1 pode-se destacar os maiores níveis de Ca ($3,24 \text{ cmolc dm}^{-3}$), CTC ($11,78 \text{ cmolc dm}^{-3}$), MO ($21,60 \text{ g Kg}^{-1}$) e menor quantidade de Al trocável ($0,06 \text{ cmolc dm}^{-3}$) no solo comparado ao Grupo 2, onde se registraram menores níveis de Ca ($1,94 \text{ cmolc dm}^{-3}$), CTC ($9,09 \text{ cmolc dm}^{-3}$), MO ($16,94 \text{ g Kg}^{-1}$) e maiores valores de Al trocável ($0,15 \text{ cmolc dm}^{-3}$) (Tabela 12).

A maior porcentagem de infecção em plantas do Grupo 2 pode estar relacionada a presença de alumínio (Al^{+3}) no solo, até $0,85 \text{ cmolc dm}^{-3}$. Este elemento é um dos principais problemas em solos ácidos pelo aumento de sua disponibilidade e ao seu efeito fitotóxico, expresso, principalmente, pela redução do desenvolvimento das raízes e sua capacidade de absorção de água e nutrientes do solo (RAIJ, 1991). A acidez do solo pode dever-se ao material de origem, à decomposição de resíduos orgânicos pelos microrganismos, à absorção de nutrientes pelas plantas e à ação antropogênica (MEURER, 2010). O tipo de manejo do solo também interfere diretamente na acidez, devido ao aumento de processos erosivos e remoção das camadas superficiais do solo, além da extração de cátions básicos pelas culturas e pela lixiviação (RAIJ, 1991). A menor disponibilidade de nutrientes como P, Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} e micronutrientes para as plantas (FAQUIN, 2005) comprometem o status nutricional das plantas e as tornam mais vulnerável a estresses e à infecção de alguns fitopatógenos (MASCHENER, 2012).

Quanto ao acúmulo de nutrientes pelas plantas, estes foram maiores em folhas que no caule e raiz para G1 e G2 corroborando com Dechen et al. (1979). Os nutrientes totais mais acumulados nesses órgãos foram, em ordem decrescente, Ca, K, N, P e Mg (Figura 15). Estes resultados estão de acordo com os descritos para a cultura do tomateiro (FAYAD et al., 2002). Uma vez que não foi considerado acúmulo dos nutrientes em frutos o acúmulo de Ca em raiz, caule e folha foram maiores que de K e N. Lucena et al. (2013) encontraram maiores concentrações de Ca em folhas quando comparado a outros órgãos. Segundo o autor esse nutriente tende a acumular mais em órgãos vegetativos. O cálcio possui importante papel nos mecanismos de defesa das plantas contra doenças, desde reconhecimento do patógeno à estabilização de membranas e da parede celular. O aumento da disponibilidade Ca pode suprimir o processo de infecção fúngica (MASCHENER, 2012) e, baixos níveis de cálcio na raiz, podem favorecer a penetração e infecção das plantas. O K acumula, principalmente, em folhas novas e órgãos vegetativos em crescimento, e principalmente nos frutos (MEURER, 2010). Segundo Silva et al. (2006), o potássio é o elemento mais extraído pelas plantas de tomateiro e sua deficiência provoca o lento crescimento, atrofiamento de folhas mais novas e amarelecimento das mais velhas. Geralmente, potássio tende a melhorar a sanidade das plantas e é relatado na literatura como benéfico ajudando a planta a tolerar o ataque de patógenos (PERRENOUD, 1990). Perrenoud (1990) cita os seguintes aspectos sobre o K x doenças: 1- efeito direto no número de patógenos, desenvolvimento, multiplicação, sobrevivência e ciclo de vida; 2- efeito direto na severidade da doença, afetando o metabolismo interno na planta e; 3- afeta a habilidade da planta em se recuperar de algum ataque por patógeno. O efeito no baixo conteúdo de potássio em plantas foi relatado por Cao et al. (2016), onde a deficiência do nutriente resultou em alta taxa de severidade da murcha-de-fusário em morangueiros. O nitrogênio tem papel fundamental no crescimento das plantas sendo fundamental nos estádios iniciais de desenvolvimento da planta sendo o transporte via xilema principalmente para parte aérea (SOUZA e FERNANDES, 2006). O estímulo ou

supressão da doença, leva em consideração o tipo de fertilizante aplicado, uma vez que fertilizantes na forma de amônio NH_4^+ elevam a acidez do solo favorecendo a doença e na forma de nitrato NO_3^- suprimem (CARVALHO et al., 2005). O ataque de patógenos em resposta ao baixo conteúdo de fósforo nas plantas é resultado do desenvolvimento radicular limitado o que por reduzir a absorção de todos os nutrientes (MASCHENER, 2012).

Quando se compara a exigência nutricional da cultura com o encontrado no trabalho verifica-se que as adubações feitas não têm suprido as necessidades da cultura. Resposta essa que pode estar ocorrendo devido ao esgotamento da fertilidade solo. A associação dessas características acaba por favorecer problemas fitossanitários como o aparecimento de murchas por FOL como observado na pesquisa.

4 CONCLUSÕES

1. As práticas de manejo do solo e da cultura adotadas pelos produtores da região de Nova Friburgo contribuem para a dispersão e sobrevivência do inóculo do patógeno nas lavouras e na região;
2. O efeito negativo das práticas de manejo adotadas sobre a conservação e fertilidade do solo resultam em condições mais favoráveis ao patógeno e ao desenvolvimento da doença;
3. Práticas adequadas de manejo do solo da região, correção da acidez do solo e uso de cultivares resistentes à raça 3 devem ser adotados na região.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plants diseases caused by fungi: vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). In: **Plant Pathology**, 2005. cap. 11, p. 523-526.
- AJILOGBA, C. F.; BABALOLA, O. O. Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. **Biocontrol Science**, v. 18, n. 3, p. 117-127, 2013.
- AMIR, H.; ALABOUCETTE, C. Involvement of soil abiotic factors in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilts. **Soil Biol. Biochem.**, v. 25, n. 2, p. 157-164, 1993.
- BARROS, K. B. de; AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L.; SILVA, S. C. da. Diversidade da fauna do solo em sequência cultural com cultivo de couve-flor. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009.
- BHERING, A. S.; CARMO, M. G. F; MATOS, T. S.; LIMA, E. S. A.; SOBRINHO, N. M. B. A. Soil factor related to the severity of clubroot in Rio de Janeiro, Brazil. **Plant Disease**, v. 101, n. 8, p. 1345-1353, 2017.
- CAO, Z. Q.; FAN, T. F.; BI, Y. M.; TIAN, G. L.; ZHANG, L. S. Potassium deficiency and root exudates reduce root growth and increase *Fusarium oxysporum* growth and disease incidence in continuously cultivated strawberry. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**, v. 44, n. 1, p. 58-68, 2016.
- CARVALHO, A. O.; JACOB NETO, J.; CARMO, M. G. F. Colonização de raízes de tomateiro por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em solução nutritiva com três fontes de nitrogênio. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 26-32, 2005.
- CASELA, C. R.; FERREIRA, A. Manejo da resistência genética a patógenos nas culturas de milho e sorgo. In.: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 6., 2006, Lavras. Manejo integrado de doenças de grandes culturas: feijão, batata, milho e sorgo. Lavras: UFLA: DFP: NEFIT, 2006. p. 184-201.
- DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. 1995. **Basic Plant Pathology Methods**. Boca Raton: Lewis. 434p.
- DECHEN, A. R.; HAAG, H. P.; SARRUGE, J. R.; DE OLIVEIRA, G. D.; GALLO, J. R.; MARTINS, F. P.; SCARANARI, H. S. Absorption of nutrients by grapevine under field conditions. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 36, p. 269-330, 1979.
- DI, X.; GOMILA, J.; MA, L.; VAN DEN BURG, H. A.; TAKKEN, F. L. Uptake of the *Fusarium* effector *Avr2* by tomato is not a cell autonomous event. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.
- DONAGEMA, G. K; CAMPOS, D. V. B de.; CALDERANO, S. B.; TEIXEIRA, W. G.; VIANA J. H. M. **Manual e métodos de análise de solo**. Embrapa solos. 2ª ed. 230p.

EMATER-RIO. **Relatório por municípios do sistema ASPA/AGROGEO – ano 2016, Rio de Janeiro.** Disponível em: <http://www.emater.rj.gov.br/images/munic2016.htm>. Acesso em: 12 jul. 2017.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas.** Lavras: UFLA/FAEPE, Curso de Pós-Graduação “Lato Sensu” (Especialização) a Distância: Solos e Meio ambiente, 2005. 186p.

FAYAD, J. A.; FONTES, P. C. R.; CARDOSO, A. A.; FINGER, F. L.; FERREIRA, F. A. Absorção de nutrientes pelo tomateiro cultivado sob condições de campo e de ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 1 p. 90-94, 2002.

FANG, X.; YOU, M. P.; BARBETTI, M. Reduced severity and impact of *Fusarium* wilt on strawberry by manipulation of soil pH, soil organic amendments and crop rotation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 134, n. 3, p. 619-629, 2012.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças.** 3º ed. rev. E ampl. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2008. 421p.

FREIRE, L. R.; ANJOS, L. H. C.; PERIERA, M. G.; ZONTA, E.; LIMA, E.; SANTOS, G. A.; SOBRINHO, N. M. B. A.; EIRA, P. A. Fertilidade do Solo. In: FREIRE, L. R.; BALIEIRO, F. C.; ZONTA, E.; ANJOS, L. H. C.; PEREIRA, M. G.; LIMA, E.; GUERRA, J. G. M.; FERREIRA, M. A. A.; LEAL, M. A. A.; CAMPOS, D. V. B.; POLIDORO, J. C. **Manual de Calagem e Adubação do Estado do Rio de Janeiro.** Embrapa, Brasília, DF, 2013. 430p.

GATCH, E. W.; DU TOIT, L. J. Limestone-mediated suppression of *Fusarium* wilt in spinach seed crops. **Plant Disease**, v. 101, n. 1, p. 81-94, 2017.

GONÇALVES, A. D. M. **Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro.** 2015. 121f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI, A. M. BAKER, B.; MCGRATH, D. J.; JONES, D. A. Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 448-463, 2016.

GRISEL, P. N.; ASSIS, R. L. Dinâmica Agrária da região sudoeste do município de Nova Friburgo e os atuais desafios de sua produção hortícola familiar. **Embrapa Agrobiologia, Documentos**, 299. Seropédica, RJ, 2015. 83p.

GRISEL, P. N.; ASSIS, R. L. Adoção de práticas agrícolas sustentáveis: estudo de caso de um sistema de produção hortícola familiar em ambiente de montanha. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 29, n. 1, p. 133-158, 2012.

GRISEL, P. N.; ASSIS, R. L. O papel das instituições na dinâmica da transição agroecológica: estudo de caso em Nova Friburgo (RJ). **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011.

GRISEL, P. N. Avaliação do uso dos serviços ecossistêmicos e capacidades: comparação de dois sistemas de produção hortícola em Nova Friburgo (RJ). **Reeds working papers / Cahiers de Reeds**, v. 1, n. 15, p. 1-20, 2011.

GUIMARÃES, M. A. S.; TEIXEIRA, J. H. S.; CARDOSO, S. C. Ocorrência de doenças do tomateiro na região de Guanambi, BA. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 5, p. 38-42, 2015.

GULLINO, M. L.; DAUGHTREY, M. L.; GARIBALDI, A.; ELMER, W. H. *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management. **Crop Protection**, v. 73, p. 50-59, 2015.

HAIR, J. F.; ANDERSON, R. E.; TATHAM, R. L.; BLACK, W. C. **Análise multivariada de dados**. Trad. Adonai S. Sant'Anna e Anselmo C. Neto. 5 ed. Porto Alegre: Bookman, 2005. 600p.

LAPIDUS, G. A. **Progresso temporal da murcha de fusário em tomateiro sob diferentes disponibilidades de água no solo**. 2013. 71f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia). Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília. 2013.

LIU, S.; WU, F.; WEN, X. Allelopathic effects of root exudates of Chinese onion on tomato growth and the pathogen *Fusarium oxysporum* (Sch1) f. sp. *lycopersici*. **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 2, p. 387, 2013.

LUCENA, R. R. M.; NEGREIROS, M. Z.; MEDEIROS, J. F.; BATISTA, T. M. V.; BESSA, A. T. M.; LOPES, W. A. R. Acúmulo de massa seca e nutrientes pelo tomateiro 'SM-16' cultivado em solo com diferentes coberturas. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 401-409, 2013.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 3.ed London: Elsevier, 2012. 643p.

MCGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78-92, 2015.

MEURER, E. J. **Fundamentos de Química do Solo**. 4. ed. Editora Evangraf, 2010. 266p.

MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of cluster in a data set. **Psychometrika**, v. 50, p. 159-179, 1985.

MOLHER, C. L.; JOHNSON, S. E. **Crop rotation on organic farms: a planning manual**, 2009. 177p.

NESHEV, G. **Alternatives to replace methyl bromide for soil-borne pest control in East and Central Europe**. In.: Labrada, R., p. 1-14, FAO. 2008.

NIST. **National Institute of Standards and Technology. Standard Reference Materials 1573a Tomato Leaves**. November 22. 1995.

PEREIRA, R. R. Agricultura familiar na Região Serrana Fluminense-RJ- Problemática ambiental e pluriatividade: estudo de caso do distrito de São Pedro da Serra- Nova Friburgo. **Semina: Ciências Sociais e Humanas**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 51-60, 2008.

PEREIRA, R. B.; PINHEIRO, J. B. Murcha-de-fusário em tomateiro. **Embrapa, Comunicado Técnico 105**, 2014. 8p.

PERRENOUD, S. Potassium and plant health. **Potassium and Plant Health**, 1990. 365p.

RAIJ, B. VAN. **Fertilidade do Solo e Adubação**. Piracicaba: Agronômica Ceres, Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1991. 343p.

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

REIS, E. M.; CASA, R. T; BIANCHIN, V. Controle de doenças em plantas pela rotação de culturas. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2011.

SILVA, J. B. C.; GIORDANO, L. B.; FURUMOTO, O.; BOITEUX, L. S.; FRANÇA, H. F.; BÔAS, G. L. V.; BRANCO, M. C.; MEDEIROS, M. A.; MAROUELLI, W.; SILVA, W. L. C.; LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C.; NASCIMENTO, W. M.; PEREIRA, W. Cultivo de Tomate para industrialização. **Embrapa Hortaliças**, n. 1-2, 2006.

SILVA, J. A. C.; OLIVEIRA, L. A. N. A cultura do tomate no estado do Rio de Janeiro: municípios produtores, produção e área colhida- 2010 a 2015. **Informação Tecnológica**, Pesagro, RJ, v. 1, n. 92, 2016.

SOUSA, F. F. **Fatores de transferência de metais pesados do solo para plantas de tomate cultivadas na Região de Nova Friburgo, RJ. 2017.** 154f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia). Instituto de Agronomia, Departamento de Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

SOUSA, S. R.; FERNADES. M. S. Nitrogênio In.: FERNADES, M. S. **Nutrição Mineral de Plantas**. Viçosa, Minas Gerais, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006, 216-245p.

SOUZA, L. T.; MICHEREFF, S. J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, D. E. G. T.; FERRAZ, E.; LIMA, G. S. A.; REIS, A. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 102-106, 2010.

SMITH, S. N. An overview of ecological and habitat aspects in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. **Plant Pathol Bull**, v. 16, p. 97-120, 2007.

TEDESCO, M. J. **Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄**. UFRGS, 1983. 23p.

USEPA, **United State Environmental Protection Agency: Method 3050. Acid digestion of sediments, sludges, and soils**, 1996. <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods>. Acesso em: 01 Jun. 2015.

USEPA, **United State Environmental Protection Agency: USEPA 3050B, Method 3050B. Acid Digestion of Sediments, Sludges and Soils**, 2008. Disponível em: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3050b.pdf>. Acesso em: 01 Jun. 2015.

WEBB, K. M.; DELGROSSO, S. J.; WEST, M. S.; FREEMAN, C.; BRENNER, T. Influence of environment, crop age and cultivar on the development and severity of *Fusarium* yellows in field-grown sugar beet. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 37-47, 2017.

YERGEAU, E.; LABOUR, K.; HAMEL, C.; VUJANOVIC, V.; NAKANO-HYLANDER, A.; JEANNOTTE, R.; ST-ARNAUD, M. Patterns of *Fusarium* community structure and abundance in relation to spatial, abiotic and biotic factors in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 1, p. 34-42, 2009.

VAN BRUGGEN, A. H.; SHARMA, K.; KAKU, E.; KARFOPOULOS, S.; ZELENEV, V. V.; BLOK, W. J. Soil health indicators and *Fusarium* wilt suppression in organically and conventionally managed greenhouse soils. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 192-201, 2015.

CAPÍTULO IV

CARACTERIZAÇÃO DE ACESSOS DE TOMATEIRO QUANTO A RESISTÊNCIA ÀS RAÇAS 1, 2 E 3 DE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

RESUMO

A principal estratégia para controle da murcha-de-fusário do tomateiro, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL), é a resistência genética. Até então já foram relatadas três raças fisiológicas de FOL, raças 1, 2 e 3, identificadas com base na capacidade de infectarem variedades com genes específicos de resistência. No entanto, a disponibilidade de cultivares resistentes às três raças, especialmente à raça 3, é muito limitada. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência/suscetibilidade de cerca de 100 acessos de tomateiro (Coleção de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ) às raças 1, 2 e 3 de FOL, e testar diferentes métodos de avaliação e de análise. Mudanças foram inoculadas com suspensão de esporos de cada uma das três raças, aos 20 dias após a semeadura, e avaliadas 21 dias após com a atribuição de notas descritivas de severidade e medição da porcentagem de infecção do sistema vascular e do comprimento e massa fresca da parte aérea e das raízes. Como padrão, utilizaram-se cinco variedades diferenciadoras. Houve alta correlação entre as avaliações feitas com escala de notas e a medição da porcentagem de infecção do sistema vascular estes se correlacionaram de forma negativa com a massa fresca e comprimento de raiz e parte aérea. Identificaram-se 22 acessos com reação semelhante à imune à raça 1 (MMBF 01/96): ENAS 1019, ENAS 1121, ENAS 1123, ENAS 1126, ENAS 1127, ENAS 1228, ENAS 1245, ENAS 1402, ENAS 1406, ENAS 1605, ENAS 2018, ENAS 2020, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2033, ENAS 2047, ENAS 2051, ENAS 2052, ENAS 2054, ENAS 2055, ENAS 2056 e o híbrido Mascote. Quanto à raça 2, (MMBF 02/96 e MMBF 152/12) identificaram-se cinco acessos com reação SI: ENAS 2018, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2054 e ENAS 2055. Nenhum dos acessos testados apresentou reação SI ou de resistência parcial (AR) à raça 3 (FUS 2903). A variável escala de notas e % de infecção se correlacionou positivamente, podendo ambos os métodos ser utilizados na classificação de cultivares resistentes e suscetíveis. Contudo tais variáveis correlacionaram-se negativamente com massa fresca e comprimento de raiz e parte aérea, mostrando que maiores valores correspondem ao menor desenvolvimento da planta.

Palavras-chave: *Solanum lycopersicum*. Murcha-de-fusário. Acessos. Metodologia.

ABSTRACT

Three races (races 1, 2 and 3) of the pathogen have been described around the world, including in Brazil. The main disease control strategy for *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is the use of cultivars with race-specific resistance. However, most of the cultivars available display resistance only to race 1 and 2 of FOL and a few have resistance to the three races. The present work aimed to evaluate the resistance/susceptibility of 100 tomatoes accessions (obtained from the germoplasm collection - Department of Crop Science of the UFRRJ) to the three races of the pathogen, as well as, to test different methods of evaluation and analysis. The seedlings were inoculated with spore suspension solution 20 days after sowing and the severity was evaluated 21 days after inoculation with *Fusarium*. The analysis performed was based in the using scale of grades, evaluation of vascular discoloration, stem length and fresh weight of shoots and roots. Five differential cultivars were used as control. Scale of grades and vascular discoloration has showed high positive correlation and these variables correlated negatively with fresh weight and length of root and shoot. 22 tomatoes accessions displayed an immune-like resistant reaction to race 1 (MMBF 01/96): ENAS 1019, ENAS 1121, ENAS 1123, ENAS 1126, ENAS 1127, ENAS 1228, ENAS 1245, ENAS 1402, ENAS 1406, ENAS 1605, ENAS 2018, ENAS 2020, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2033, ENAS 2047, ENAS 2051, ENAS 2052, ENAS 2054, ENAS 2055, ENAS 2056 and Mascote. For the race 2 (MMBF 02/96 and MMBF 152/12), five accessions displayed immune-like resistant reaction: ENAS 2018, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2054 and ENAS 2055. No resistance to race 3 (FUS 2903) was identified in the accessions evaluated. The scale of grades and vascular discoloration correlated positively and both methods can be used to identify tolerant and susceptible genotypes to *Fusarium* wilt. However, these variables correlated negatively with fresh weight and length of roots and shoots, showing that higher values correspond to lower plant development.

Key words: *Solanum lycopersicum*. *Fusarium* wilt. Accession. Methodology.

1 INTRODUÇÃO

O tomateiro é uma hortaliça de grande importância econômica e social no Brasil e no mundo, decorrente do alto volume produzido e comercializado e contingente de mão de obra empregado, especialmente no segmento para consumo *in natura*. O Brasil se enquadra na nona posição no ranking mundial de maiores produtores de tomate com uma produção de 3,7 milhões de toneladas anuais, produzidos em cerca de 57.590 ha (IBGE, 2017). O maior país produtor é a China com produção de aproximadamente 52 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017).

A cultura é bastante exigente em manejo e tratos culturais e sujeita a vários problemas fitossanitários que podem afetar severamente a produtividade e qualidade dos frutos. As doenças, em especial as causadas por patógenos de solo, podem inviabilizar o seu cultivo em áreas contaminadas por vários anos (MCGOVERN, 2015). Entre estas, está a murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W. C. Snyder e N. H. Hansen (FOL), que infecta e coloniza o sistema vascular das plantas, afetando diretamente a produtividade e a qualidade dos frutos (AGRIOS, 2005). O fungo é habitual do solo onde pode sobreviver por mais de dez anos, seja como saprófita em restos culturais e, principalmente, por estruturas de resistência, os clamidósporos (MCGOVERN, 2015). O patógeno penetra inicialmente pelas raízes e em seguida infecta e coloniza os vasos do xilema resultando na deposição de esporos e micélio do fungo além da produção pela planta de gomas e tiloses com consequente descoloração e entupimento dos vasos (AGRIOS, 2005) que resultam amarelecimento das folhas baixas, murcha e, em casos mais severos, morte da planta (MA et al., 2013).

A murcha-de-fusário é de ocorrência generalizada em diferentes regiões onde se cultiva o tomateiro com maiores perdas quando predominam temperaturas mais elevadas (cerca de 28°C), cultivo em solos ácidos e plantio de cultivares suscetíveis à(s) raça(s) predominante(s) na área (REIS et al., 2005; MCGOVERN, 2015). Até então já foram descritas três raças do patógeno, raças 1, 2 e 3. A raça 1 foi identificada em 1886 por Booth (BOOTH, 1971), a raça 2 em 1945 por Alexandre e Tucker em Ohio (ALEXANDRE e TUCKER, 1945) e a raça 3 em 1978 por Grattidge e O'Brien na Austrália (GRATTIDGE e O'BRIEN, 1982). Estas três raças já foram relatadas no Brasil, sendo as raças 1 e 2 de distribuição mais generalizada e a raça 3, de ocorrência mais restrita. A raça 3 foi pela primeira vez reportada no Brasil em Venda Nova do Imigrante, Espírito Santo (REIS et al., 2005) e, posteriormente, nos municípios de São José de Ubá e Itaocara, Estado do Rio de Janeiro (REIS e BOITEUX, 2007) na Bahia (BARBOZA et al., 2013) e em Minas Gerais (GONÇALVES et al., 2013).

As raças de FOL são classificadas com base em suas habilidades de infectar uma série de variedades diferenciadoras portadoras de genes específicos de resistência: *I*, *I-2* e *I-3* que conferem resistência às raças 1, 2 e 3, respectivamente (TAKKEN e REP, 2010). Isto ocorre, pois FOL produz fatores de virulência, proteínas SIX (*secreted in xylem*) que podem ser reconhecidas e bloqueadas, ou não, pelos genes específicos de resistência. Dessa forma a presença do gene *I* em tomateiro confere resistência a raça 1, podendo a planta ser infectada pelas outras raças, *I-2* confere resistência a raça 2 e *I-3* à raça 3, sendo esta última raça capaz de infectar plantas contendo genes *I* e *I-2* (TAKKEN e REP, 2010; GONZÁLEZ et al., 2012; MA et al., 2013). Um novo gene, *I-7*, que confere resistência à raça 3 vem sendo caracterizado e introgridido em cultivares comerciais de tomateiro e sua presença também condiciona resistência às raças 1 e 2 de FOL (GONZALEZ-CENDALES et al., 2016).

O controle da murcha-de-fusário deve ser baseado em um conjunto de estratégias que visem à redução da densidade de inóculo do patógeno e de sua habilidade de infectar o

tomateiro. Entre estas estratégias estão rotação de culturas, manejo da fertilidade do solo, controle químico e biológico e, principalmente, uso de cultivares resistentes, mesmo que sejam como porta-enxerto (MCGOVERN, 2015). O controle químico não é recomendável devido a sua baixa eficiência principalmente por se tratar de um fungo habitual do solo (SRIVASTAVA et al., 2010). O controle biológico, apesar de bastante estudado (SHANMUNGAM e KANOUIA, 2011; ROCHA e MOURA, 2013; ROCHA et al., 2017), ainda tem aplicação prática limitada. Dessa forma, o uso de cultivares resistentes é a estratégia mais prática, econômica e ecologicamente correta (MCGOVERN, 2015).

A caracterização de genótipos de tomateiro quanto a resistência às raças de FOL tem sido feita em testes com inoculação de mudas e avaliações com auxílio de escala descritivas com notas baseadas em sintomas externos e/ou descoloração vascular (FUCHS et al., 1997; SANTOS, 1997; REIS e BOITEUX, 2007; SRINIVASAN et al., 2009). A avaliação da severidade baseada apenas em sintomas externos pode levar a erros, pois outros fatores, bióticos ou abióticos, também podem induzir murchas e amarelecimento de folhas. Desta forma, esta pode ser complementada com avaliações da ocorrência e extensão da necrose vascular em amostras destrutivas (MAFFIA e MIZUBUTI, 2005) de forma a se obter dados quantitativos da intensidade da doença e dados de desenvolvimento da planta, como o acúmulo de massa.

O uso de cultivares resistentes assume especial importância em cultivos orgânicos pelas restrições legais a uma série de estratégias normalmente aceitas em cultivos convencionais. A busca de novos genótipos resistentes é essencial face à eminente restrição ao uso de sementes comerciais e cultivares híbridas (MAPA, 2011).

O Departamento de Fitotecnia da UFRRJ vem, desde 2005, avaliando e selecionando acessos de tomateiro para agricultores familiares e agricultura orgânica. A coleção conta hoje com mais de 300 acessos que já foram, parcialmente, avaliados ou caracterizados quanto a critérios fitotécnicos, qualidades físico-químicas, aceitação pelo mercado e resistência a importantes doenças da cultura como requeima, causada por *Phytophthora infestans*, e mancha-de-estenfílio, causada por *Stemphylium solani* e *Stemphylium lycopersici*, visando seu uso em programas de melhoramento ou recomendação para este segmento.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (a) identificar acessos resistentes que possam ser indicados para o cultivo ou programa de melhoramento de tomateiro para a agricultura familiar e orgânica; (b) avaliar a reatividade diferencial as raças 1, 2 e 3 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* de acessos de tomateiro do banco de germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ por meio de ferramentas multivariadas e; (c) padronizar a metodologia de avaliação e análise de resistência à murcha-de-fusário.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado em condições de casa de vegetação no setor de Horticultura e no Laboratório de Epidemiologia e Patologia de Sementes do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ, em intervalos, no período de novembro de 2014 a janeiro de 2017. Avaliaram-se cerca de 100 acessos de tomateiro pertencentes ao Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ quanto a resistência às raças 1, 2 e 3 de FOL (Figura 16).



Figura 16. Condução em casa de vegetação de acessos quanto a resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A) Raça 1 (MMBF 01/96). B) Raça 2 (MMBF 02/96 e MMBF 152/12) e; C) Raça 3 (FUS 2903).

Como inóculo nos diferentes ensaios, utilizaram-se quatro isolados de FOL: MMBF 01/96 (raça 1), MMBF 02/96 (raça 2) e MMBF 152/12 (raça 2), adquiridos junto à Coleção de Culturas Fúngicas Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”, Instituto Biológico, SP (INSTITUTO BIOLÓGICO, 2010) e; FUS 2903 (raça 3) obtido de plantas de tomate em Nova Friburgo, RJ.

Os isolados foram previamente identificados, em ensaio anterior, quanto as raças com o uso da série diferenciadora de raças – ‘Ponderosa’, suscetível às raças 1, 2 e 3; ‘Caline IPA-7’ e ‘Santa Clara Miss Brasil’, resistentes à raça 1; ‘Floradade’ resistente às raças 1 e 2; e *S. pennellii* ‘LA 716’, resistente às raças 1, 2 e 3 (Capítulo 1). Uma vez confirmada a virulência e as raças dos respectivos isolados, estes foram reisolados e preservados em óleo mineral e solo para utilização nos experimentos.

2.1 Caracterização de Acessos de Tomateiro quanto a Resistência às Raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Utilizaram-se como diferenciadoras variedades previamente identificadas e citadas como resistentes às raças 1, 2 e 3 de FOL. Para avaliação da resistência à raça 1, utilizou o isolado MMBF 01/96 e, como padrões de suscetibilidade/resistência as variedades ‘Ponderosa’ (suscetível às raças 1, 2 e 3), ‘Caline IPA-7’ e ‘Santa Clara Miss Brasil’ (resistentes à raça 1). Para avaliação da resistência à raça 2, utilizaram-se os isolados MMBF 02/96 e MMBF 152/12 e como padrões de suscetibilidade/resistência as variedades ‘Ponderosa’, ‘Santa Clara Miss Brasil’ e ‘Caline IPA-7’, ‘Floradade’ (resistente às raças 1 e 2) e *S. pennellii* ‘LA 716’ (resistente as raças 1, 2 e 3). Para avaliação da resistência à raça 3, utilizou-se o isolado FUS 2903 e como padrões de suscetibilidade/resistência as variedades ‘Ponderosa’, ‘Santa Clara Miss Brasil’, ‘Caline IPA-7’, ‘Floradade’ e *S. pennellii* ‘LA 716’.

Como inóculo, utilizaram-se suspensões de esporos em água destilada e autoclavada

contendo 1×10^6 microconídios mL^{-1} , ajustada em câmara de Neubaer. Os esporos foram obtidos a partir de culturas crescidas em placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA) por 14 dias a 25°C sob 12 horas de luz.

As mudas dos diferentes genótipos foram produzidas em bandejas de plástico de 200 células contendo substrato comercial autoclavado e mantidas em casa de vegetação. Aos 20 dias após o semeio, coletaram-se as mudas, lavaram-se e cortaram-se as extremidades das raízes a 2,0 cm da porção apical. Em seguida, imergiram-se as raízes na suspensão de conídios por 5 minutos. Como tratamento controle imergiram-se as raízes em água destilada e autoclavada. Após a inoculação, transplantaram-se as mudas para tubetes (6,3 x 13 cm) contendo mistura autoclavada (120°C e 1 atm por 60 minutos em dois dias consecutivos) de solo, areia e substrato comercial (1:1:1). Após o transplante, adicionaram-se 2,0 mL da suspensão de conídios a cada tubete. No tratamento controle, adicionaram-se 2,0 mL de água destilada e autoclavada. No dia do transplante e semanalmente foi adicionada solução nutritiva segundo Hoagland e Arnon (1950).

Avaliaram-se as plantas aos 21 dias após a inoculação utilizando-se três critérios: (a) severidade estimada por escala descritiva (SANTOS, 1997); (b) extensão da haste colonizada em relação ao comprimento da planta (% infecção - I); (c) desenvolvimento das plantas - massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR) e comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR).

No primeiro critério, atribuíram-se notas de acordo com os sintomas observados, sendo: (1) plantas sem sintomas; (2) plantas sem sintomas de murcha ou amarelecimento, mas com escurecimento vascular; (3) plantas com escurecimento vascular e com murcha ou amarelecimento foliar; (4) plantas com murcha intensa, associada com amarelecimento e necrose foliar e; (5) plantas mortas (SANTOS, 1997). Com base nas notas de severidade atribuídas a cada planta, calcularam-se as médias para cada genótipo e, em seguida, agruparam-se estes em cinco classes: 1,0= semelhante à imune (SI); 1,1-2,0= altamente resistente (AR); 2,1-3,0= medianamente resistente (MR); 3,1-4,0= suscetível (SU) e; 4,1-5,0= altamente suscetível (AS) (REIS et al., 2004). No segundo critério, mediu-se a extensão dos feixes vasculares necrosados e a extensão total das hastes e com base nestas medidas calculou-se a relação entre estas e os dados foram expressos em porcentagem de infecção (I%) (CARVALHO, 2003). Para determinação do desenvolvimento das plantas, mediu-se o comprimento das hastes e das raízes com auxílio de régua milimetrada e determinou-se a massa fresca de ambas em balança semianalítica.

Utilizou o delineamento inteiramente ao acaso com sete repetições, sendo cada repetição uma planta inoculada. Para avaliação da resistência à raça 1, utilizaram-se 96 acessos mais 3 variedades diferenciadoras. Para avaliação da resistência à raça 2, utilizaram-se 96 acessos mais 3 (MMBF 02/96) e 4 (MMBF152/12) variedades diferenciadoras. Para avaliação da resistência à raça 3, utilizaram-se 97 acessos mais cinco variedades diferenciadoras. Como controle, utilizaram-se quatro plantas não inoculadas de cada genótipo.

2.2 Análise Estatística

Inicialmente, realizou-se a análise de correlação de Pearson entre dados de severidade, avaliados com base na porcentagem de infecção do sistema vascular (I%) e notas atribuídas (N) (SANTOS, 1997; REIS et al., 2004) e dados de desenvolvimento das plantas, massa fresca e comprimento de parte aérea (MFPA, CPA) e de raiz (MFR, CR). Efetuou-se, ainda uma análise de regressão entre N e I% ajustando o modelo de acordo com a significância do teste F, ao nível de 5%, e pelo coeficiente de determinação (R^2) e os dados expressos graficamente utilizando o programa SigmaPlot.

Visando o agrupamento dos acessos conforme a resposta de reação a FOL procedeu-se à aplicação das metodologias componentes principais e UPGMA, respectivamente análises de dispersão e agrupamento. Para a análise de componentes principais (ACP), os gráficos foram plotados conforme Cruz e Carneiro (2003). Segundo os autores é necessário acumular no mínimo 80% da variação nos primeiros dois ou três componentes principais, o que caracterizará, conforme a magnitude da estimativa, uma plotagem bidimensional ou tridimensional.

Estimou-se ainda a distância de Mahalanobis para obtenção da matriz fenética, na qual foi utilizada para a estimação da matriz cofenética via metodologia UPGMA (*Unweighted pair-group method using an arithmetic average*). O resultado desta análise foi a confecção de um dendrograma contendo todos os tratamentos analisados. Estimou-se também a correlação cofenética (CCC) entre as referidas matrizes (SOKAL e ROHLF, 1962) e o Teste de Mantel com 1000 permutações. O número de grupos no dendrograma foi estimado conforme Kelley et al. (1996).

As análises estatísticas foram realizadas no Programa R, versão 2.14.1 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Correlação entre Severidade da Murcha-de-Fusário e Desenvolvimento de Plantas de Tomateiro Inoculadas com Quatro Isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Observaram-se coeficientes de correlação (r) significativos e negativos entre a estimativa da severidade obtida com base na escala de notas, N, (SANTOS, 1997; REIS et al., 2004) e porcentagem de infecção do sistema vascular, I%, (CARVALHO, 2003) com a massa fresca e comprimento de parte aérea (MFPA, CPA) e de raiz (MFR, CR) (Tabela 13).

Tabela 13. Coeficientes de correlação de Pearson (r) entre dados de severidade da doença, avaliada com base em escala de notas (N), porcentagem de infecção vascular (I%) e desenvolvimento da planta, expresso em massa fresca da parte aérea (MFPA), massa fresca de raiz (MFR), comprimento de parte aérea (CPA) e comprimento de raiz (CR), obtidos em mudas de diferentes genótipos de tomateiro inoculadas com quatro isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, MMBF 01/96 (raça 1), MMBF 02/96 e MMBF 152/12 (raça 2) e FUS 2903 (raça 3).

		Coeficiente de correlação (r)					
		Isolado MMBF 01/96 (Raça 1)					
Variáveis	N	I%	MFPA	MFR	CPA	CR	
N	1,0000						
I%	0,9510	1,0000					
MFPA	-0,8693	-0,9181	1,0000				
MFR	-0,7806	-0,8078	0,8938	1,0000			
CPA	-0,7628	-0,8143	0,8871	0,7769	1,0000		
CR	-0,7196	-0,6840	0,7659	0,7809	0,6938	1,0000	
		Isolado MMBF 02/96 (Raça 2)					
N	1,0000						
I%	0,8677	1,0000					
MFPA	-0,5957	-0,7186	1,0000				
MFR	-0,4092	-0,4982	0,7203	1,0000			
CPA	-0,5565	-0,7261	0,6506	0,5827	1,0000		
CR	-0,4048	-0,4723	0,5682	0,5289	0,5633	1,0000	
		Isolado MMBF 152/12 (Raça 2)					
N	1,0000						
I%	0,9229	1,0000					
MFPA	-0,5523	-0,6264	1,0000				
MFR	-0,4570	-0,5390	0,7237	1,0000			
CPA	-0,7182	-0,7618	0,8585	0,7241	1,0000		
CR	-0,5547	-0,4895	0,3352	0,5368	0,5102	1,0000	
		Isolado FUS 2903 (Raça 3)					
N	1,0000						
I%	0,7615	1,0000					
MFPA	-0,8815	-0,6006	1,0000				
MFR	-0,6658	-0,2337	0,8744	1,0000			
CPA	-0,9113	-0,6272	0,9452	0,8473	1,0000		
CR	-0,8044	-0,3943	0,9198	0,9071	0,9342	1,0000	

Dados obtidos em sete plantas de aproximadamente 100 genótipos distintos de tomateiro.

De forma geral, as correlações foram mais estreitas entre a severidade da doença e o desenvolvimento da parte aérea que o da raiz, e quando avaliadas com base em I%. Estas correlações negativas entre severidade da doença e desenvolvimento das plantas resultam da redução do fluxo de água e nutrientes pela colonização e bloqueio dos vasos do xilema e, consequentemente, murchas, deficiência nutricional e subdesenvolvimento das plantas ou, morte, em casos mais severos (AGRIOS, 2005). O desenvolvimento da planta é afetado proporcionalmente a severidade dos sintomas (GHAEMI et al., 2011).

Observaram-se coeficientes r significativos e positivos entre as duas variáveis utilizadas para quantificar a severidade da doença, N e I%, sendo estes de 95,10%, 86,77%, 92,29% e 76,15% para os isolados MMBF 01/96 (raça 1), MMBF 02/96 e MMBF 152/12 (raça 2) e FUS 2903 (raça 3) (Tabela 13).

Para todos os isolados, exceto FUS 2903, houve uma maior frequência de N variando de 2 a 4 e de I% de 30% a 90%. Para o isolado FUS 2903, houve uma concentração de N entre 4 e 5 e I% de 80% a 100%, indicando alta suscetibilidade dos acessos à raça 3.

A relação entre N e I% foi linear e positiva, o que sugere a evolução dos sintomas como previsto na escala com o avanço da infecção do sistema vascular. Para o isolado FUS 2903, porém, ao qual a maioria dos acessos foram suscetíveis ou altamente suscetíveis, o ajuste foi realizado pela função quadrática ($R^2=0,84$) e o coeficiente de correlação de Pearson menor ($r=0,76$). O resultado destas interações, isolado FUS 2903 de FOL x genótipos de tomateiro, pode estar relacionado à rápida colonização do sistema vascular e rápida expressão dos sintomas, murchas e amarelecimento e necrose de folhas, e à dificuldade em se classificar diferenças entre as notas 3 e 4. Nota-se, por exemplo, alta frequência de casos com 100% de infecção do sistema vascular, mas com notas variando de 4 a 5 (Figura 17, Tabela 14 e Tabela 15).

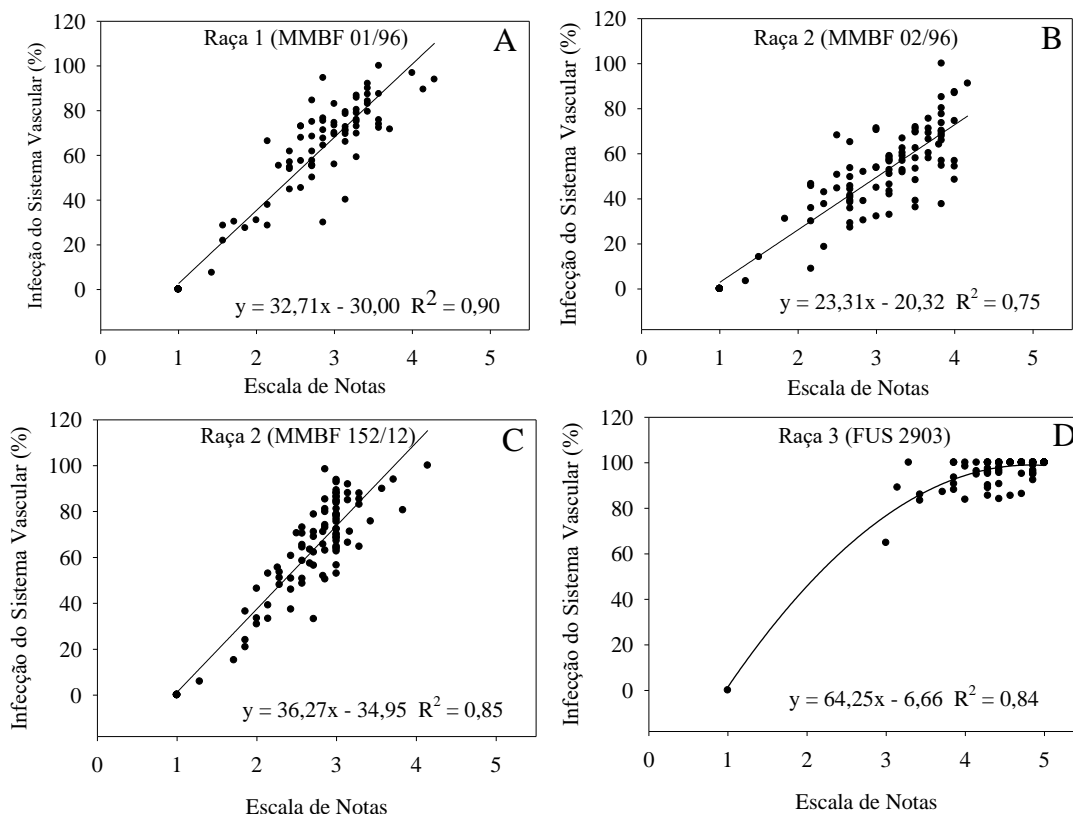


Figura 17. Porcentagem de infecção do sistema vascular (I%) observada em diferentes amostras de plantas e correspondentes notas de severidade (SANTOS, 1997; REIS et al.,

2004), observadas em 100 acessos de tomateiro inoculados com quatro isolados de três diferentes raças *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: A) MMBF 01/96 (raça 1); B) MMBF 02/96 (raça 2); C) MMBF 152/12 (raça 2) e D) FUS 2903 (raça 3).

Tabela 14. Esquema comparativo da resistência dos acessos as raças 1 e 3 (FUS 2903) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, onde N corresponde a notas e I a porcentagem de infecção do sistema vascular, classes de reação segundo a escala de Reis et al. (2004) e grupo pertencente segundo análise estatística por Mahalanobis (continua).

Raça 1 (MMBF 01/96)					Raça 3 (FUS 2903)				
CULT	I	N	Reação	Grupo	CULT	I	N	Reação	Grupo
CALINE IPA 7	0,00	1,00	SI	VI	<i>S.pennellii</i> LA 716	0,00	1,00	SI	I
ENAS 1019	0,00	1,00	SI	VI	MASCOTE	64,77	3,00	MR	II
ENAS 1121	0,00	1,00	SI	VI	BRS IMIGRANTE	89,09	3,14	SU	VII
ENAS 1223	0,00	1,00	SI	XI	ENAS 2024	100,00	3,29	SU	VII
ENAS 1226	0,00	1,00	SI	XI	ENAS 1214	83,33	3,43	SU	IV
ENAS 1227	0,00	1,00	SI	XI	ENAS 1216	85,97	3,43	SU	VII
ENAS 1228	0,00	1,00	SI	XI	ENAS 2033	87,14	3,71	SU	V
ENAS 1245	0,00	1,00	SI	VIII	ENAS 1218	88,09	3,86	SU	VIII
ENAS 1402	0,00	1,00	SI	VII	ENAS 1037	90,65	3,86	SU	VIII
ENAS 1406	0,00	1,00	SI	VII	ENAS 1601	93,45	3,86	SU	VII
ENAS 1605	0,00	1,00	SI	VI	ENAS 1402	100,00	3,86	SU	III
ENAS 2018	0,00	1,00	SI	VII	ENAS 1404	100,00	3,86	SU	VII
ENAS 2020	0,00	1,00	SI	VII	ENAS 2029	100,00	3,86	SU	VII
ENAS 2023	0,00	1,00	SI	VIII	ENAS 1228	83,72	4,00	SU	VIII
ENAS 2029	0,00	1,00	SI	VIII	ENAS 1007	98,33	4,00	SU	VII
ENAS 2033	0,00	1,00	SI	VII	ENAS 2010	100,00	4,00	SU	VIII
ENAS 2047	0,00	1,00	SI	XI	ENAS 2018	94,79	4,14	AS	VIII
ENAS 2051	0,00	1,00	SI	VI	ENAS 1031	96,30	4,14	AS	VIII
ENAS 2052	0,00	1,00	SI	VII	ENAS 2023	100,00	4,14	AS	VIII
ENAS 2054	0,00	1,00	SI	VI	ENAS 2015	85,53	4,29	AS	VIII
ENAS 2055	0,00	1,00	SI	VI	ENAS 1121	88,90	4,29	AS	VIII
ENAS 2056	0,00	1,00	SI	VI	ENAS 1227	90,05	4,29	AS	VIII
MASCOTE	0,00	1,00	SI	IX	ENAS 2011	95,09	4,29	AS	VIII
SANTA CLARA	0,00	1,00	SI	VI	ENAS 1078	95,69	4,29	AS	VIII
ENAS 1229	7,50	1,43	AR	X	ENAS 1217	95,86	4,29	AS	VIII
ENAS 1404	28,57	1,57	AR	VI	ENAS 1406	97,39	4,29	AS	VIII
ENAS 2045	21,85	1,57	AR	VI	ENAS 1223	100,00	4,29	AS	VIII
ENAS 2024	30,31	1,71	AR	VIII	ENAS 2020	100,00	4,29	AS	VIII
ENAS 1218	27,41	1,86	AR	X	ENAS 2031	100,00	4,29	AS	VIII
ENAS 1601	30,96	2,00	AR	IV	ENAS 2046	100,00	4,29	AS	VIII
ENAS 1217	66,28	2,14	MR	IV	SANTA CLARA	100,00	4,29	AS	VIII
ENAS 2015	28,57	2,14	MR	VIII	ENAS 2041	84,03	4,43	AS	VIII
ENAS 2028	37,81	2,14	MR	V	ENAS 2037	90,60	4,43	AS	VIII
ENAS 2040	55,31	2,29	MR	IV	ENAS 2021	95,50	4,43	AS	VIII
ENAS 1214	44,72	2,43	MR	V	ENAS 1008	96,50	4,43	AS	VIII

Tabela 14. Continuação.

ENAS 1401	54,67	2,43	MR	V	FLORADADE	97,80	4,43	AS	VIII
ENAS 1604	61,68	2,43	MR	IV	ENAS 1401	99,79	4,43	AS	VIII
ENAS 2038	56,95	2,43	MR	IV	ENAS 1017	100,00	4,43	AS	VIII
ENAS 2046	53,83	2,43	MR	IV	ENAS 1245	100,00	4,43	AS	VIII
ENAS 1060	67,83	2,57	MR	IV	ENAS 2005	100,00	4,43	AS	VIII
ENAS 2003	57,47	2,57	MR	V	ENAS 2013	100,00	4,43	AS	VIII
ENAS 2005	45,36	2,57	MR	V	ENAS 2026	85,42	4,57	AS	VI
ENAS 2006	72,97	2,57	MR	IV	ENAS 1229	100,00	4,57	AS	VIII
ENAS 2041	72,90	2,57	MR	IV	ENAS 2008	100,00	4,57	AS	VIII
ENAS 1026	84,49	2,71	MR	IV	ENAS 2016	100,00	4,57	AS	VIII
ENAS 1031	61,68	2,71	MR	V	ENAS 2025	100,00	4,57	AS	VIII
ENAS 1032	55,45	2,71	MR	V	ENAS 2027	100,00	4,57	AS	VIII
ENAS 1136	55,42	2,71	MR	V	ENAS 2051	100,00	4,57	AS	VIII
ENAS 1153	55,09	2,71	MR	V	ENAS 2056	86,25	4,71	AS	VIII
ENAS 1219	55,44	2,71	MR	V	ENAS 1016	95,10	4,71	AS	VIII
ENAS 1403	74,91	2,71	MR	IV	ENAS 1006	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 2002	50,06	2,71	MR	V	ENAS 1013	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 2008	57,60	2,71	MR	IV	ENAS 1029	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 2031	68,34	2,71	MR	IV	ENAS 1122	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 1037	67,56	2,86	MR	V	ENAS 1158	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 1120	75,36	2,86	MR	V	ENAS 1603	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 1224	29,92	2,86	MR	II	ENAS 2012	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 2004	76,52	2,86	MR	V	ENAS 2030	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 2012	64,41	2,86	MR	V	ENAS 2040	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 2026	71,26	2,86	MR	IV	ENAS 2045	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 2030	94,59	2,86	MR	IV	PAB	100,00	4,71	AS	VIII
ENAS 1007	82,94	3,00	MR	V	ENAS 2042	92,32	4,86	AS	VIII
ENAS 1010	74,49	3,00	MR	V	ENAS 2006	94,81	4,86	AS	VIII
ENAS 1016	73,33	3,00	MR	V	ENAS 2053	95,19	4,86	AS	VIII
ENAS 1078	70,05	3,00	MR	V	ENAS 1153	95,79	4,86	AS	VIII
ENAS 1242	55,94	3,00	MR	V	ENAS 1136	96,54	4,86	AS	VIII
ENAS 2037	69,24	3,00	MR	V	ENAS 1012	98,80	4,86	AS	VIII
ENAS 1143	70,77	3,14	SU	V	ENAS 1224	99,72	4,86	AS	VIII
ENAS 1158	78,45	3,14	SU	V	ENAS 1019	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 1250	71,36	3,14	SU	V	ENAS 1026	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 2011	40,13	3,14	SU	II	ENAS 1032	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 2016	69,49	3,14	SU	V	ENAS 1124	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 2022	79,32	3,14	SU	V	ENAS 1125	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 2027	72,64	3,14	SU	V	ENAS 1225	100,00	4,86	AS	VIII
PONDEROSA	65,98	3,14	SU	V	ENAS 1240	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 1006	86,70	3,29	SU	V	ENAS 1242	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 1012	75,07	3,29	SU	V	ENAS 1249	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 1124	78,86	3,29	SU	V	ENAS 1605	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 1216	69,70	3,29	SU	V	ENAS 2028	100,00	4,86	AS	VIII

Tabela 14. Continuação.

ENAS 1225	80,33	3,29	SU	V	ENAS 2038	100,00	4,86	AS	VIII
ENAS 1249	85,71	3,29	SU	III	CALINE IPA 7	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1603	75,85	3,29	SU	V	ENAS 1010	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 2010	59,13	3,29	SU	V	ENAS 1033	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 2053	72,89	3,29	SU	V	ENAS 1060	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1008	89,96	3,43	SU	V	ENAS 1120	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1033	84,18	3,43	SU	V	ENAS 1126	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1122	79,43	3,43	SU	V	ENAS 1143	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1126	87,26	3,43	SU	V	ENAS 1219	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1240	92,00	3,43	SU	V	ENAS 1226	100,00	5,00	AS	VIII
PAB	82,94	3,43	SU	V	ENAS 1250	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1017	87,45	3,57	SU	V	ENAS 1403	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 2013	73,82	3,57	SU	V	ENAS 1604	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 2021	75,76	3,57	SU	V	ENAS 2002	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 2025	72,25	3,57	SU	V	ENAS 2003	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 2042	100,00	3,57	SU	I	ENAS 2004	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1125	71,59	3,71	SU	V	ENAS 2007	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 2007	96,79	4,00	SU	V	ENAS 2022	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1013	89,38	4,14	AS	V	ENAS 2047	100,00	5,00	AS	VIII
ENAS 1029	93,89	4,29	AS	V	ENAS 2052	100,00	5,00	AS	VIII
					ENAS 2054	100,00	5,00	AS	VIII
					ENAS 2055	100,00	5,00	AS	VIII
					PONDEROSA	100,00	5,00	AS	VIII

Tabela 15. Esquema comparativo da resistência dos acessos as raças 2 (MMBF 02/96 e MMBF152/12) de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, onde N corresponde a notas e I a porcentagem de infecção do sistema vascular, classes de reação segundo a escala de Reis et al. (2004) e grupo pertencente segundo análise estatística por Mahalanobis (continua).

Raça 2 (MMBF 02/96)					Raça 2 (MMBF 152/12)				
CULT	I	N	Reação	Grupos	CULT	I	N	Reação	Grupo
ENAS 1226	0,00	1,00	SI	VIII	ENAS 1223	0,00	1,00	SI	I
ENAS 1229	0,00	1,00	SI	II	ENAS 2018	0,00	1,00	SI	II
ENAS 2018	0,00	1,00	SI	II	ENAS 2020	0,00	1,00	SI	II
ENAS 2023	0,00	1,00	SI	II	ENAS 2023	0,00	1,00	SI	II
ENAS 2029	0,00	1,00	SI	II	ENAS 2029	0,00	1,00	SI	II
ENAS 2033	0,00	1,00	SI	II	ENAS 2054	0,00	1,00	SI	III
ENAS 2054	0,00	1,00	SI	VIII	ENAS 2055	0,00	1,00	SI	III
ENAS 2055	0,00	1,00	SI	VIII	ENAS 2056	0,00	1,00	SI	III
FLORADADE	0,00	1,00	SI	II	<i>S. pennellii</i> LA 716	0,00	1,00	SI	II
ENAS 2020	3,41	1,33	AR	I	FLORADADE	0,00	1,00	SI	III
ENAS 1223	14,13	1,50	AR	VIII	ENAS 2033	5,88	1,29	AR	II
ENAS 1404	31,13	1,83	AR	VIII	ENAS 1226	15,18	1,71	AR	I
ENAS 1218	45,68	2,17	MR	VI	ENAS 1216	20,88	1,86	AR	IV

Tabela 15. Continuação

ENAS 1402	46,55	2,17	MR	V	MASCOTE	23,95	1,86	AR	IV
ENAS 1603	30,01	2,17	MR	VIII	ENAS 1214	36,42	1,86	AR	VI
ENAS 2024	35,83	2,17	MR	II	ENAS 1229	30,85	2,00	AR	I
ENAS 2056	8,91	2,17	MR	VIII	ENAS 1153	33,40	2,00	AR	VII
ENAS 2006	42,90	2,33	MR	VI	ENAS 2024	46,37	2,00	AR	VIII
ENAS 2038	37,59	2,33	MR	VI	ENAS 1406	33,25	2,14	MR	VII
MASCOTE	18,61	2,33	MR	VIII	ENAS 2012	39,12	2,14	MR	VIII
ENAS 1019	44,60	2,50	MR	VI	ENAS 2051	52,94	2,14	MR	VI
ENAS 2002	50,60	2,50	MR	VI	ENAS 2013	55,53	2,26	MR	VIII
ENAS 2007	68,09	2,50	MR	V	ENAS 2031	48,01	2,29	MR	VIII
ENAS 1214	29,18	2,67	MR	VI	ENAS 2010	51,06	2,29	MR	VIII
ENAS 1227	27,19	2,67	MR	VI	ENAS 1605	53,49	2,29	MR	VI
ENAS 1245	41,44	2,67	MR	VI	ENAS 2046	37,30	2,43	MR	VI
ENAS 1406	35,72	2,67	MR	V	ENAS 1404	45,95	2,43	MR	VIII
ENAS 1601	49,59	2,67	MR	VI	ENAS 1143	50,78	2,43	MR	VIII
ENAS 1605	38,35	2,67	MR	III	ENAS 2025	60,66	2,43	MR	VIII
ENAS 2028	40,64	2,67	MR	V	CALINE IPA 7	70,52	2,50	MR	VIII
ENAS 2031	45,58	2,67	MR	VI	ENAS 1158	48,55	2,57	MR	VIII
ENAS 2037	39,15	2,67	MR	VI	ENAS 1121	50,65	2,57	MR	VI
ENAS 2042	53,55	2,67	MR	V	ENAS 1016	58,48	2,57	MR	VIII
ENAS 2045	65,10	2,67	MR	VI	ENAS 1120	64,33	2,57	MR	VIII
ENAS 2051	44,20	2,67	MR	VI	ENAS 2011	65,42	2,57	MR	VIII
ENAS 1217	38,98	2,83	MR	VI	ENAS 1032	70,37	2,57	MR	VIII
ENAS 1228	30,42	2,83	MR	VIII	ENAS 1225	73,03	2,57	MR	VIII
ENAS 1240	51,89	2,83	MR	VI	ENAS 2040	63,36	2,67	MR	VIII
ENAS 1013	53,95	3,00	MR	VI	ENAS 2028	57,35	2,67	MR	VIII
ENAS 1121	32,18	3,00	MR	VI	ENAS 2041	33,11	2,71	MR	VIII
ENAS 1224	53,64	3,00	MR	VI	ENAS 1078	56,40	2,71	MR	VI
ENAS 2008	71,26	3,00	MR	V	ENAS 1242	62,17	2,71	MR	VIII
ENAS 2013	44,85	3,00	MR	VI	ENAS 1219	68,92	2,71	MR	VIII
SANTA CLARA	70,47	3,00	MR	VI	ENAS 2005	71,03	2,71	MR	VIII
ENAS 1006	57,01	3,17	SU	VI	ENAS 2053	78,68	2,71	MR	VIII
ENAS 1026	50,99	3,17	SU	VI	ENAS 1136	65,64	2,83	MR	VI
ENAS 1031	41,95	3,17	SU	VI	ENAS 1218	51,89	2,83	MR	VI
ENAS 1037	46,29	3,17	SU	VI	ENAS 2038	71,08	2,83	MR	VIII
ENAS 1060	43,33	3,17	SU	VI	ENAS 1037	50,43	2,86	MR	VIII
ENAS 1401	32,90	3,17	SU	VI	ENAS 1124	62,96	2,86	MR	VIII
ENAS 2011	58,94	3,17	SU	VI	ENAS 2015	72,92	2,86	MR	VIII
ENAS 2015	52,73	3,17	SU	VI	ENAS 2008	74,08	2,86	MR	VIII
ENAS 2021	56,56	3,17	SU	VI	ENAS 1060	79,78	2,86	MR	VIII
ENAS 2025	58,47	3,17	SU	VI	ENAS 2022	81,02	2,86	MR	V
ENAS 2040	57,60	3,17	SU	VI	ENAS 2047	85,23	2,86	MR	VI
ENAS 1016	62,36	3,33	SU	VI	ENAS 2007	98,37	2,86	MR	VIII
ENAS 1136	56,83	3,33	SU	VI	ENAS 1019	52,94	3,00	MR	VI

Tabela 15. Continuação.

ENAS 1242	52,66	3,33	SU	VI	ENAS 1228	56,53	3,00	MR	VIII
ENAS 1249	66,77	3,33	SU	VI	ENAS 1017	62,61	3,00	MR	VIII
ENAS 2004	58,94	3,33	SU	VI	ENAS 1401	63,63	3,00	MR	VI
ENAS 2030	51,73	3,33	SU	IV	ENAS 1403	64,21	3,00	MR	VI
PAB	60,31	3,33	SU	VI	ENAS 1402	64,77	3,00	MR	VIII
ENAS 1017	57,93	3,50	SU	VI	ENAS 1122	67,12	3,00	MR	VIII
ENAS 1078	36,21	3,50	SU	VI	ENAS 2045	68,41	3,00	MR	VIII
ENAS 1143	71,04	3,50	SU	VI	ENAS 1603	68,64	3,00	MR	VI
ENAS 1219	62,42	3,50	SU	VI	ENAS 1126	69,65	3,00	MR	VIII
ENAS 1250	53,36	3,50	SU	VI	ENAS 1013	70,15	3,00	MR	VI
ENAS 1604	69,39	3,50	SU	VI	ENAS 1026	72,24	3,00	MR	VIII
ENAS 2022	48,23	3,50	SU	VII	ENAS 1227	72,29	3,00	MR	VIII
ENAS 2041	39,10	3,50	SU	VI	ENAS 1125	75,53	3,00	MR	VIII
ENAS 2053	69,71	3,50	SU	VI	ENAS 1245	76,52	3,00	MR	VIII
PONDEROSA	71,76	3,50	SU	IV	ENAS 2003	77,70	3,00	MR	VIII
ENAS 1008	71,12	3,67	SU	IV	ENAS 1031	78,33	3,00	MR	VIII
ENAS 1033	75,51	3,67	SU	VI	ENAS 2052	78,63	3,00	MR	VIII
ENAS 2003	57,95	3,67	SU	VI	ENAS 2042	78,75	3,00	MR	VIII
ENAS 2026	66,35	3,67	SU	VI	ENAS 1008	81,05	3,00	MR	VIII
ENAS 2027	60,23	3,67	SU	VI	ENAS 2021	83,71	3,00	MR	VIII
ENAS 2052	69,14	3,67	SU	VI	ENAS 1012	84,27	3,00	MR	VIII
ENAS 2010	64,02	3,80	SU	VI	ENAS 2030	84,77	3,00	MR	VIII
ENAS 1010	68,66	3,83	SU	VI	PAB	86,15	3,00	MR	VIII
ENAS 1029	100,00	3,83	SU	IV	ENAS 2006	86,58	3,00	MR	VIII
ENAS 1032	67,73	3,83	SU	VI	ENAS 1249	87,99	3,00	MR	VIII
ENAS 1120	65,86	3,83	SU	VI	ENAS 1601	88,07	3,00	MR	VIII
ENAS 1122	56,82	3,83	SU	VI	ENAS 1240	89,22	3,00	MR	VIII
ENAS 1124	80,17	3,83	SU	VI	ENAS 2016	92,76	3,00	MR	VIII
ENAS 1125	69,71	3,83	SU	IV	ENAS 1224	93,75	3,00	MR	VIII
ENAS 1126	85,09	3,83	SU	VI	ENAS 1010	66,37	3,14	SU	VIII
ENAS 1216	54,65	3,83	SU	VI	ENAS 2002	84,90	3,14	SU	VIII
ENAS 1403	70,20	3,83	SU	VI	ENAS 2037	87,97	3,14	SU	VIII
ENAS 2005	37,60	3,83	SU	VI	PONDEROSA	91,81	3,14	SU	VIII
ENAS 2016	73,57	3,83	SU	VI	ENAS 2026	71,18	3,17	SU	VIII
ENAS 2047	77,53	3,83	SU	IV	ENAS 1217	64,65	3,29	SU	VII
ENAS 1007	87,31	4,00	SU	IV	ENAS 1604	83,00	3,29	SU	VIII
ENAS 1012	74,51	4,00	SU	VI	ENAS 1250	85,31	3,29	SU	VIII
ENAS 1153	54,30	4,00	SU	VI	ENAS 1033	87,84	3,29	SU	VIII
ENAS 1225	86,89	4,00	SU	VI	ENAS 2004	75,68	3,43	SU	VIII
ENAS 2012	56,74	4,00	SU	IV	ENAS 1007	89,85	3,57	SU	VIII
ENAS 2046	48,45	4,00	SU	VI	ENAS 1006	93,91	3,71	SU	VIII
ENAS 1158	91,11	4,17	AS	IV	ENAS 2027	80,55	3,83	SU	VIII
					ENAS 1029	100,00	4,14	AS	VIII

Avaliação com base na escala de Santos (1997) leva em consideração a presença ou não de descoloração vascular, sem especificar a sua extensão, e a presença ou não de sintomas, desde iniciais a severos como murcha intensa e amarelecimento e necrose das folhas e morte de plantas, distribuídos em cinco classes, e maiores valores em quadros mais severos. Não discrimina, porém, a intensidade ou extensão da necrose vascular. Ou seja, há plantas com necrose em toda a extensão do xilema (I=100%), mas que não apresentem murcha ou murcha severa, poderiam ser atribuídas notas menores, N igual a 2 ou 3, respectivamente ou, a plantas com menor extensão de infecção do sistema vascular serem atribuídas notas mais altas (Figura 17, Tabela 14 e Tabela 15). Como a murcha e o amarelecimento de folhas podem decorrer de estresses hídricos temporários e deficiência nutricional, respectivamente, erros na atribuição das notas são passíveis de serem cometidos. Assim, como as medições do comprimento das plantas e da extensão da descoloração vascular são simples, rápidas e fáceis, a sua realização pode ser útil e complementar as avaliações com uso da escala de notas em trabalhos com a murcha-de-fusário do tomateiro. A utilização de ambas as variáveis pode levar a resultados mais precisos, dependendo do objetivo do trabalho e da precisão desejada (VALE et al., 2004).

3.2 Caracterização dos Acessos de Tomateiro Quanto a Resistência às Raças 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Alta correspondência entre os valores de N e de I% foram também observadas nas análises de componentes principais (ACP). Os dois primeiros componentes principais (CP1+CP2) acumularam 90,69%, 79,82%, 82,06% e 96,04% da variação observada nos testes de inoculação dos genótipos com os isolados MMBF 01/96 (raças 1), MMBF 02/96 (raça 2), MMBF 52/12 (raça 2) e FUS 2903 (raça 3), plotados em gráficos de dispersão bidimensional, conforme recomendado por Cruz e Carneiro (2003) (Figura 18).

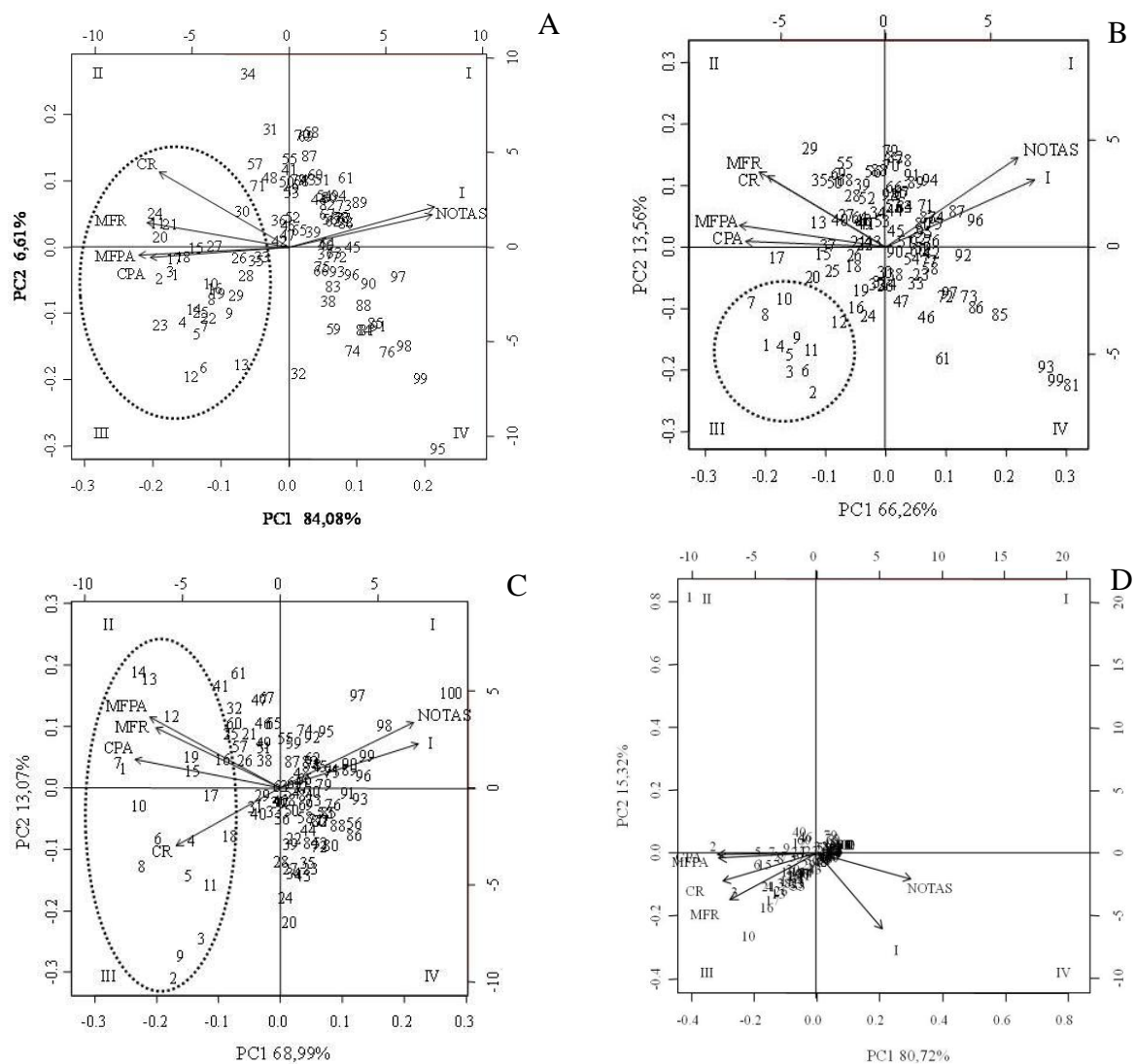


Figura 18. Análise da componente principal de genótipos de tomateiro do Banco de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ quanto a resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, baseado na severidade (Notas), porcentagem de infecção vascular (I%), massa fresca da parte aérea (MFPA) e da raiz (MFR), comprimento da parte aérea (CPA) e da raiz (CR). A) Raça 1 (MMBF 01/96); B) Raça 2 (MMBF 02/96); C) Raça 2 (MMBF 152/12) e; D) Raça 3 (FUS 2903).

A avaliação da resistência de tomateiro a FOL tem sido feita com base na escala de Santos (1997) seguido de classificação em cinco classes conforme a média destas notas, desde semelhante a imune, SI, para médias igual a 1,0 até altamente suscetível, AS, para médias variando de 4,1 a 5,0 (REIS et al., 2004). Neste caso estão sendo identificados desde acessos portadores de genes de resistência raça-específica às raças 1 e 2 de FOL, como ENAS 2018, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2054 E ENAS 2055, que apresentaram reação SI ao isolado da raça 1 e aos dois da raça 2, à resistência parcial ou quantitativa. No primeiro caso, tem-se reação incompatível ou equivalente à SI e, esta, por ser uma resistência qualitativa ou completa *sensu* Van der Plank (1963), não está sujeita a efeito do ambiente e é facilmente identificada em testes de inoculação sob condições ótimas e controladas (SOUZA et al., 2010). No segundo caso, têm-se duas classes, AR e MR, cujas médias variam de 1,1 a 2,0 e de 2,1 a 3,0, respectivamente. Por ser resistência parcial ou quantitativa, estão sujeitas a efeito de

ambiente e seriam mais facilmente identificadas em ensaios em que não predominem condições extremas favoráveis ao patógeno (CAMARGO, 1995; POLAND et al., 2009; WEBB et al., 2017). Então, a princípio, a grande dificuldade na caracterização está na identificação dos acessos com reação AR e MR, dentro das quatro categorias previstas por Reis et al. (2004) que variam de altamente resistente a altamente suscetível por serem os resultados dependentes de outras variáveis como concentração de inóculo, condições de ambiente e método de inoculação (DAVIS et al., 1996). Ainda, o próprio critério de avaliação, na medida em que este é qualitativo e sujeito a subjetividades, pode afetar o enquadramento de alguns acessos nas respectivas classes.

Tendo como base a classificação do germoplasma de tomateiro pela escala de Santos (1997) e critério de Reis et al. (2004), identificaram-se 22 (23%) acessos com reação semelhante a imune (SI), seis (6%) altamente resistentes (AR), 37 (39%) medianamente resistentes (MR), 28 (29%) suscetíveis (SU) e três (3%) altamente suscetíveis (AS) à raça 1 de FOL (Figura 19A e Tabela 14).

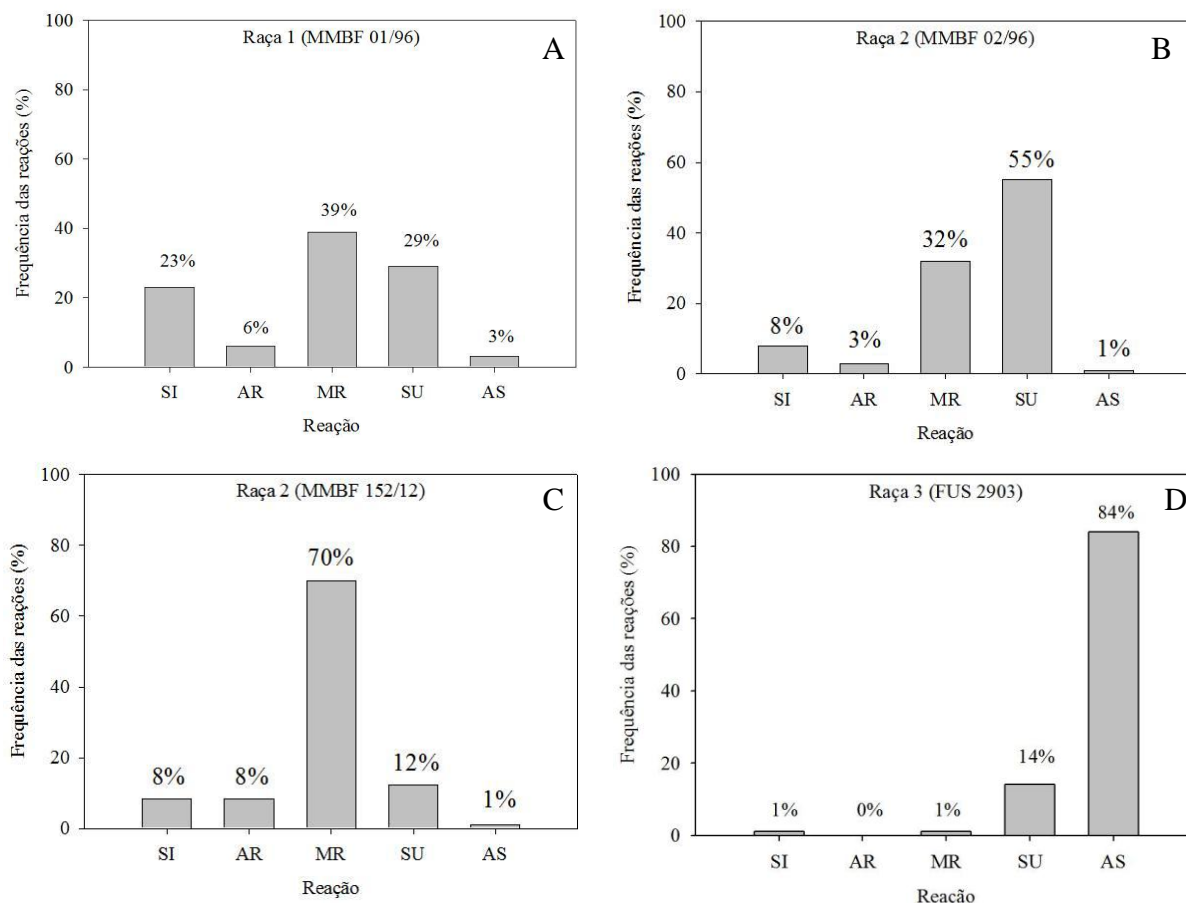


Figura 19. Frequência de classes de reação Segundo escala de Santos (1997) e Reis et al. (2004) de cerca de 100 acessos de tomateiro a isolados das raças fisiológicas 1, 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Alta expressão de acessos medianamente resistente (MR) para a raça 1 tem sido comumente observada em trabalhos de caracterização de genótipos indicando a existência de resistência parcial ou incompleta para esta raça (CARRER-FILHO et al., 2015). Apesar da resistência completa, raça específica, ser a base do controle genético da doença em FOL é sabido que essa pode ser facilmente quebrada pelas outras raças do patógeno conforme verificado no Capítulo 2 deste trabalho. Ou seja, detecção de acessos com resistência parcial é

de extrema importância uma vez que fornecem fatores de resistência durável e podem ser complementares à resistência com reação SI (MUNDT, 2014).

A análise de componentes principais (ACP) feita com base nos dados de desenvolvimento das plantas (MFPA, MFR, CPA e CR) e de severidade (N e I%) nos diferentes acessos inoculados com o isolado da raça 1 de FOL (Figura 18A) alocou nos quadrantes esquerdo, superior e inferior (II e III), acessos com maiores valores de MFPA e CPA e que apresentaram reação semelhante a imune (SI) - (1) 'Caline IPA-7', (2) ENAS 1019, (3) ENAS 1121, (4) ENAS 1223, (5) ENAS 1226, (6) ENAS 1227, (7) ENAS 1228, (8) ENAS 1245, (9) ENAS 1402, (10) ENAS 1406, (11) ENAS 1605, (12) ENAS 2018, (13) ENAS 2020, (14) ENAS 2023, (15) ENAS 2029, (16) ENAS 2033, (17) ENAS 2047, (18) ENAS 2051, (19) ENAS 2052, (20) ENAS 2054, (21) ENAS 2055, (22) ENAS 2056, (23) Mascote, (24) 'Santa Clara' - e acessos com reação altamente resistente (AR) - (25) ENAS 1229, (26) ENAS 1404, (27) ENAS 2045, (28) ENAS 2024 e (29) ENAS 1218. Nos quadrantes direitos, superior e inferior (I e IV), foram alocados em sua maioria os acessos com menor desenvolvimento das plantas e maior severidade da doença e classificados como medianamente resistente (MR), suscetíveis (SU) e altamente suscetíveis (AS). Este resultado confirma a correlação positiva entre resistência à doença e desenvolvimento das plantas, ou seja, plantas com menores notas de severidade e menor porcentagem de infecção do xilema apresentaram maiores massa fresca e comprimento de parte aérea e de raiz. Contudo, quando ocorre a infecção da planta hospedeira, existe uma alta correlação entre desenvolvimento dos sintomas e aumento da severidade da doença com redução da massa fresca decorrente do amarelecimento, necrose e murcha das folhas (DI et al., 2016).

Na avaliação dos acessos quanto a resistência à raça 2, feita utilizando-se os dois isolados MMBF 02/96 e MMBF 152/12, identificaram-se com base nos critérios de Santos (1997) e Reis et al. (2004) oito (8%) e oito (8%) acessos com reação semelhante a imune (SI), três (3%) e oito (8%) altamente resistentes (AR), 31 (32%) e 67 (70%) medianamente resistentes (MR), 53(55%) e 12 (12%) suscetíveis (SU) e um (1%) e um (1%) na classe altamente suscetíveis (AS), respectivamente. Os resultados mostraram variações na classificação dos acessos em função do isolado, apesar de não variarem muito quanto à severidade média final (MMBF 152/12 com I variando de 5,88% a 100% - Infecção média=66±19%; MMBF 02/96 com I variando de 3,41% a 91% e Infecção média=53±17%) nos acessos com reação compatível. No entanto, identificaram-se maior número de acessos suscetíveis, SU e AS, nos testes feitos com os isolados MMBF 02/96 (54 acessos) que em MMBF 152/12 (13 acessos) (Figura 19B, Figura 19C e Tabela 15).

A ACP, por sua vez, também permitiu separação dos genótipos, mas com diferença na dispersão destes nos quadrantes. No teste feito com o isolado MMBF 02/96, (Figura 18B), alocaram-se os genótipos com reação semelhante à imune (SI) (1) ENAS 1226, (2) ENAS 1229, (3) ENAS 2018, (4) ENAS 2023, (5) ENAS 2029, (6) ENAS 2033, (7) ENAS 2054, (8) ENAS 2055, (9) 'Floradade', e acessos com reação altamente resistente (AR), (10) ENAS 2020, (11) ENAS 1223 e (12) ENAS 1404, no quadrante III, com correlação positiva com MFPA, MFR, CPA e CR. Os quadrantes II e III abrangeram também acessos com resposta medianamente resistente (MR), ao patógeno, ou seja, germoplasma com baixa % de infecção e, por isso, maior desenvolvimento. Acessos com reação SU e AS tiveram relação direta com o vetor I% e Notas, e ficaram alocados no primeiro e quarto quadrante, ou seja, foram mais afetados pela doença e, portanto, com maiores porcentagens de infecção e maior valor na escala de notas.

No teste feito com o isolado MMBF 152/12, menos agressivo, houve maior dispersão dos pontos representativos de cada genótipo e alocação daqueles com reação SI [(1) ENAS 1223, (2) ENAS 2018, (3) ENAS 2020, (4) ENAS 2023, (5) ENAS 2029, (6) ENAS 2054, (7) ENAS 2055, (8) ENAS 2056, (9) *S. pennellii* 'LA 716' e (10) 'Floradade'] e AR [(11) ENAS

2033, (12) ENAS 1226, (13) ENAS 1216, (14) ‘Mascote’, (15) ENAS 1214, (16) ENAS 1229, (17) ENAS 1153 e (18) ENAS 1124] em dois, II e III. Acessos MR também ficaram em sua maioria distribuídos entre os quadrantes II e III se correlacionando negativamente com infecção e notas. Os acessos com reação SU e AS ficaram dispersos nos quadrantes I e IV e com relação direta com as variáveis N e I%. Somente os acessos ENAS 2018, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2054 e ENAS 2055 apresentaram reação SI aos dois isolados, enquanto ENAS 1226, ENAS 1229, ENAS 2020 e ENAS 1223 apresentaram reação SI ou AR dependendo do isolado (Figura 18C). Esta resposta pode ser também explicada por um conjunto de fatores do lado da espécie hospedeira e do lado do patógeno. Do lado do hospedeiro, segregação ou mistura de sementes nas amostras ou variação alélica. Sabe-se que a reação de SI em tomateiro à raça 2 é conferida por um único gene, *I-2*, que é dominante (SOUZA et al., 2010). Em alguns casos como para os acessos ENAS 1214, ‘Mascote’, ENAS 1404 e ENAS 2024 a reação variou de AR a MR, e outros de AR para SU, ENAS 1216 e ENAS 1143. Souza et al. (2010) e Akram et al. (2014) também observaram variação de intensidade da doença e, portanto, diferenças na reação de acessos quando submetidos a distintos isolados da mesma raça de FOL. De acordo com Doohan et al. (2003) e Boix-Ruiz et al. (2015), a variação na intensidade da doença na mesma cultivar pode estar relacionada tanto a aspectos relacionados à interação patógeno x hospedeiro, à reação de defesa da planta e efeitos de ambiente. Possível explicação para a variação na intensidade da doença na mesma cultivar quando inoculados com diferentes isolados também pode estar relacionado ao nível de agressividade dos isolados (SOUZA et al., 2010). Acredita-se que estas diferenças de reação sejam aceitáveis, pois elas ocorrem quando as plantas são inoculadas com um mesmo isolado, sendo o resultado final obtido pelas médias das respostas/notas. Possivelmente, aumento no rigor no controle de ambiente e uso de maior número de repetições possam reduzir estas diferenças. Segundo Santos-Júnior et al. (2009) a variabilidade de resposta do mesmo acesso a diferentes raças/isolado do patógeno provavelmente se deve a resistência do tipo quantitativa (ou parcial, poligênica, horizontal). Isto indica a presença de múltiplos alelos controlando os mecanismos de defesa a murcha-de-fusário (SAXENA e CRAMER, 2009).

Na avaliação dos acessos quanto a resistência à raça 3, somente o padrão Resistente, *S. pennellii* ‘LA 716’ (1), apresentou reação SI (1%) e ficou isolado de todos os demais acessos no quadrante II, provavelmente, por ser planta de reduzido porte e menor acúmulo de massa e ter se destacado dos demais e dos vetores relativos a acúmulo de massa e crescimento. ‘Mascote’ (2) se destacou com resistência intermediária (MR), correspondendo a 1% do total avaliado. Todos os demais genótipos apresentaram reação SU (14%) (acessos do número 3 ao 16) e ficaram dispersos nos quadrantes II e III, acompanhando os vetores relacionados ao desenvolvimento das plantas. Os acessos com resposta AS (84%) (acessos de número 17 a 102 e ‘Ponderosa’, ‘Caline IPA-7’ e ‘Floradade’) distribuíram-se, em sua maioria, nos quadrantes I e IV, acompanhando positivamente os vetores relacionados à severidade e negativamente aqueles relacionados ao desenvolvimento das plantas. Este resultado revela a alta virulência e agressividade do isolado FUS 2903 aos acessos avaliados (Figura 18D e Figura 19D).

Estes resultados confirmam aqueles obtidos pela análise de correlação de Pearson (Tabela 13) e indicam que informações sobre o desenvolvimento das plantas podem também ser usadas na caracterização de acessos quanto à resistência à murcha-de-fusário. A utilização da variável massa fresca de parte aérea para avaliação da resistência a FOL foi também feita por Lievens et al. (2009) em ensaios para caracterização de isolados da raça 1, utilizando plantas sabidamente resistentes e suscetíveis. Jelinsk et al. (2017) avaliaram a severidade da murcha-de-fusário em tomateiros associando escala de notas com base em infecção vascular e massa fresca da parte aérea.

A correlação obtida entre infecção e escala de notas e os parâmetros de massa fresca e comprimento de parte aérea e de raiz para todos os isolados avaliados validam a metodologia para a avaliação de resistência de tomateiro a FOL. Dessa forma, a escala de notas e porcentagem de infecção do sistema vascular, aliada a variáveis relacionadas ao desenvolvimento da planta permitem uma mais precisa caracterização de acessos de tomateiro quanto a resistência parcial à murcha-de-fusário.

Tendo como base os resultados obtidos na ACP, realizou-se a análise agrupamento dos acessos inoculados com cada um dos quatro isolados (Figura anexo 5 e Figura anexo 6).

A correlação entre as matrizes fenética e cofenética foi estimada em 0,746 nos dados obtidos com o teste com a raça 1; de 0,718 e 0,762 nos dois isolados da raça 2 (MMBF 02/96 e MMBF 152/12, respectivamente); e 0,997 para o teste com a raça 3. Estes coeficientes foram estatisticamente significativos segundo o Teste de Mantel (Tabela anexo 8, Tabela anexo 9, Tabela anexo 10 e Tabela anexo 11).

Conforme a metodologia proposta por Kelley et al. (1996) o número ótimo de grupos ou classes no dendrograma foi estimado em 11 para os testes com a raça 1 e, em oito para os testes com os dois isolados da raça 2 e com a raça 3. Este número de grupos ou classes é maior que o previsto pela classificação de Santos (1997) e de Reis et al. (2004), apenas cinco, e mostra diferenças de resultados conforme o critério de classificação utilizado.

Para a raça 1, os 11 grupos formados abrangeram todas as classes de reação. Os grupos I e III foram formados por acessos suscetíveis, o grupo IV por acessos medianamente resistentes, os grupos II e V por mistura de acessos MR e SU. Os grupos VII, IX e XI abrangeram exclusivamente acessos semelhante a imune (SI) e os grupos VI e VIII, apesar de terem em sua maioria também acessos SI, comportaram alguns com reação altamente resistente (ENAS 1404, ENAS 2045 e ENAS 2024) e MR (ENAS 2015). Os demais acessos AR foram alocados no grupo X (Tabela 14). Apesar dessa subdivisão em grande número de grupos a análise de agrupamento permitiu a separação dos acessos de resistência (SI) dos demais acessos com resistência parcial (AR e MR) e dos suscetíveis (SU e AS).

As cultivares referências suscetíveis ('Ponderosa') e resistentes ('Santa Clara' e 'Caline IPA-7') a raça 1 se enquadraram nos grupos suscetível e resistente conforme esperado (Tabela 14 e Figura anexo 5). A resposta das cultivares referência está de acordo com trabalhos encontrados na literatura (SOUZA et al.; 2010; CANTÚ et al., 2014) e com resposta de resistência na maioria desses.

Para raça 2 (MMBF 02/96) o grupo I compreendeu o acesso ENAS 2020 (AR), o grupo II compreendeu acessos com reação SI, os grupos III e V acessos MR. O grupo VIII compreendeu acessos com reação SI, AR e MR, não permitindo uma clara distinção entre acessos com resistência total e com resistência parcial. Da mesma forma para o agrupamento VI formado por acessos MR e SU, repetindo o ocorrido para a raça 1, não diferindo resistência parcial de suscetibilidade. Em ambos os casos essa junção dos acessos pode ter sido inferida por aspectos comuns no desenvolvimento da planta. Os grupos IV e VII foram formados por acessos SU e AS. Os padrões de resistência se enquadram dentro da classe de reação esperada, suscetível para 'Ponderosa' (grupo IV) e 'Santa Clara' (VI) e semelhante a imune para 'Floradade' (grupo II) (Tabela 15 e Figura anexo 6).

O isolado MMBF 152/12, raça 2, proporcionou uma distribuição dos acessos dentro do dendrograma também em 8 grupos conseguindo também separar distintos grupos de resistência e suscetibilidade e de forma mais clara, onde os grupos I, II, III, e IV contiveram acessos SI e AR e os grupos V, VI, VII e VIII os acessos MR, SU e AS (Tabela 15 e Figura anexo 6).

O isolado FUS 2903, raça 3, separou o dendrograma em oito grupos, grupo I contendo a cultivar de referência *S. pennellii* 'LA 716', o grupo II com o genótipo medianamente

resistente ('Mascote') e os grupos III a VIII todos os acessos que apresentaram reação suscetível (S) ou altamente suscetíveis (AS) (Tabela 14 e Figura anexo 5).

Dessa forma a distribuição dentro do dendrograma UPGMA veio a complementar e a corroborar os dados obtidos na ACP fazendo, em sua maioria, a separação dentro dos grupos de resistência e suscetibilidade segundo a reação de cada acesso. Os métodos de avaliação utilizados, infecção vascular, escala de notas, massa fresca e comprimento de parte aérea e raiz, se complementam permitindo a avaliação e separação dos acessos de forma mais precisa da doença. Alguns autores utilizam a combinação de escala com outros atributos como índice de doença na folha, altura das plantas e índice de descoloração vascular (AMINI et al., 2009). Outros fazem uso da escala de notas com base na descoloração do xilema provocada pelo fungo para avaliação da reação de acessos a murcha (CANTÚ et al., 2014). Contudo a utilização de escala de notas simples baseada apenas na sintomatologia externa e visualização, sem quantificação, da descoloração vascular é comum em trabalhos (SOUZA et al., 2010; SANTOS JÚNIOR et al., 2009).

Dos acessos avaliados nenhum deles apresentou reação semelhante a imune às 3 raças de *Fusarium* e somente o acesso 'Mascote' exibiu resistência parcial (MR) à raça 3. Os genes *I-1* e *I-2* estão amplamente incorporados nas cultivares comerciais disponíveis no mercado, contudo para a raça 3 cultivares resistentes são mais escassas (GONÇALVES, 2015; MCGOVERN, 2015). A geração de cultivar de tomateiro resistente a murcha-de-fusário ocorre da introdução de genes de resistência para as respectivas raças de FOL, raça específica, genes estes com origem a partir de espécies selvagens. Para a raça 1 o gene *I* ou *I-1* foi encontrado nas espécies *S. pimpinellifolium* e *S. pennellii*. Gene *I-2*, confere resistência a raça 2, foi encontrado na espécie *S. pimpinellifolium* (BOHN e TUCKER, 1939). E também na espécie selvagem *S. pennellii* foi encontrado os genes *I-3* e *I-7* contra a raça 3 nos acessos 'LA716' e 'PI414773', respectivamente (SCOTT e JONES, 1989; GONZALEZ-CENDALES et al., 2016).

Os acessos que se destacaram por apresentarem reação de resistência às raças 1 e 2 foram: ENAS 2018, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2054 e ENAS 2055. Apesar dos resultados, os acessos com reação de resistência, AR e MR, encontradas nesse trabalho devem ser avaliados em condições de campo naturalmente infectados com as raças 1 e 2 de FOL ou em ensaios até a fase adulta da planta. Apesar dos sintomas se apresentarem em qualquer fase do desenvolvimento da planta os sintomas típicos aparecem mais frequentemente na fase de florescimento e frutificação (MCGOVERN, 2015). Outro motivo do teste a campo é para avaliação de seu potencial agrônomo e de mercado. Dessa forma, identificando, também podem ser utilizados pelos produtores de tomate. Além disso, as cultivares semelhantes a imunes e resistentes podem ser fontes potenciais para utilização em programas de melhoramento visando desenvolver novas fontes de resistência (SANTOS JÚNIOR et al., 2009).

4 CONCLUSÕES

1. Foram identificados cinco acessos com resistência simultânea às raças 1 e 2 de FOL - ENAS 2018, ENAS 2023, ENAS 2029, ENAS 2054 e ENAS 2055;
2. Não foram encontrados acessos com resistência à raça 3;
3. A cultivar 'Mascote' se destacou pela reação de resistência total (SI) a raça 1 e resistência parcial para raça 2 (classes de reação MR e AR aos isolado MMBF 02/96 e MMBF 152/12, respectivamente) e MR à raça 3 de FOL;
4. As medidas % de infecção e escala de notas aliado a parâmetros de desenvolvimento da planta são eficazes na avaliação da resistência a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Plants diseases caused by fungi: vascular wilts caused by ascomycetes and deuteromycetes (mitosporic fungi). In: **Plant Pathology**, 2005. cap. 11, p. 523-526.
- AKRAM, W.; ANJUM, T.; AHMAD, A. Basal susceptibility of tomato varieties against different isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Int J Agric Biol**, v. 16, p. 171-176, 2014.
- ALEXANDER, L. J.; TUCKER, C. M. Physiological specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Journal of Agricultural Research**, v. 70, p. 303-313, 1945.
- AMINI, J. Physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Kurdistan Province of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. **Plant Pathology Journal**, v. 8, n. 2, p. 68-73, 2009.
- BARBOZA, E. A.; CABRAL, C. S.; GONÇALVES, A. M. Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 infecting tomatoes in northeast Brazil. **Plant Disease**, v. 97, n. 3, p. 422, 2013.
- BOIX-RUIZ, A.; GÁLVEZ-PATÓN, L.; DE CARA-GARCÍA, M.; PALMERO-LLAMAS, D.; CAMACHO-FERRE, F.; TELLO-MARQUINA, J. C. Comparison of analytical techniques used to identify tomato-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. **Phytoparasitica**, v. 43, n. 4, p. 471-483, 2015.
- BOOTH, C. **The Genus *Fusarium***. Kew: England. Common-wealth Mycological Institute, 1971. 237p.
- BOHN, G. W.; TUCKER C. M. Immunity to *Fusarium* wilt in the tomato. **Science**, v. 89, n. 2322, p. 603-604, 1939.
- CAMARGO, L. E. A. Análise genética da resistência e da patogenicidade. In.: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**, 3a ed, São Paulo, ceres, 1995. cap. 24, v.1, p. 470-491.
- CANTÚ, R. R.; REBELO, J. A.; MILANESI, P. M.; GOTO, R. Reaction and resistance of tomato rootstock to *Fusarium* wilt. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1155-1158, 2014.
- CARRER FILHO, R.; OLIVEIRA, R. M.; DIAS, V. D.; BOITEUX, L. S.; DIANESE, É. D. C., CUNHA, M. G. D. Multiple sources of resistance to *Fusarium* wilt in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 12, p. 1225-1231, 2015.
- CARVALHO, A. O. **Influência da fonte de nitrogênio sobre o pH rizosfera e sobre a colonização de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder e Hansen**. 2003. 79f. Tese (Doutorado em Fitotecnia). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- CRUZ, C. D.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos Biométricos Aplicados ao Melhoramento Genético**. Volume 2. Viçosa: Editora UFV, 2003. 585 p.

DAVIS, R. D.; MOORE, N. Y.; KOCHMAN, J. K. Characterisation of a population of *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* causing wilt of cotton. **Aust. J. Agr. Res.** v. 47, p. 1143–1156, 1996.

DI, X.; GOMILA, J.; MA, L.; VAN DEN BURG, H. A.; TAKKEN, F. L. Uptake of the *Fusarium* effector *Avr2* by tomato is not a cell autonomous event. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1915, p. 1-14, 2016.

DOOHAN, F. M.; BRENNAN, J.; COOKE, B. M. Influence of climatic factors on *Fusarium* species pathogenic to cereals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 109, p. 755-768, 2003.

FAOSTAT - **FAO Statistics Division**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>. Acesso em: 13 jul. 2017.

FUCHS, J. G.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; DEFAGO, G. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato. **Plant Disease**, v. 81, n. 5, p. 492-496. 1997.

GHAEMI, A.; RAHIMI, A.; BANIHASHEMI, Z. Effects of water stress and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on growth (leaf area, plant height, shoot dry matter) and shoot nitrogen content of tomatoes under greenhouse conditions. **Iran Agricultural Research**, v. 29, n. 2, p. 51-62, 2011.

GONÇALVES, A. D. M.; AGUIAR, F. M.; LOPES, C. A.; FONSECA, M. E. N.; BOITEUX, L. S.; COSTA, H.; REIS, A. Primeiro registro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 no Estado de Minas Gerais. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 46.; Reunião Brasileira de Controle Biológico, 11., 2013, **Anais...Ouro Preto: UFV**, 2013.

GONÇALVES, A. D. M. **Diversidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* e desenvolvimento e validação de marcadores moleculares ligados a genes de resistência em tomateiro**. 2015. 121f. Tese (Doutorado em Fitopatologia), Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2015.

GONZÁLEZ, I.; ARIAS, Y.; PETEIRA, B. Aspectos generales de la interacción. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. **Rev. Protección Veg.**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2012.

GONZALEZ-CENDALES, Y.; CATANZARITI, A. M. BAKER, B.; MCGRATH, D. J.; JONES, D. A. Identification of *I-7* expands the repertoire of genes for resistance to *Fusarium* wilt in tomato to three resistance gene classes. **Molecular Plant Pathology**, v. 17, n. 3, p. 448-463, 2016.

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

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural of Experimental Station Bull**, v. 347, p. 1-32, 1950.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil**. Rio de Janeiro- Brasil, v. 30, n. 05, p. 1-83, 2017.

JELINSKI, N. A.; BROZ, K.; JONKERS, W.; MA, L. J.; KISTLER, H. C. Effector gene suites in some soil isolate of *Fusarium oxysporum* are not sufficient predictors of vascular wilt in tomato. **Phytopathology**, v. 107, n. 7, p. 842-851, 2017.

KELLEY, L. A.; GARDNER, S. P.; SUTCLIFFE, M. J. An automated approach for clustering an ensemble of NMR-derived protein structures into conformationally related subfamilies. **Protein Eng.**, v. 9, n.11, p.1063-1065, 1996.

LIEVENS, B.; HOUTERMAN, P. M.; REP, M. Effector gene screening allows unambiguous identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races and discrimination from other *formae speciales*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 300, n. 2, p. 201-215, 2009.

MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. *Fusarium* pathogenomics. **Annual Review of Microbiology**, v. 67, p. 399-416, 2013.

MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. Epidemiologia de doenças radiculares. In. MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**, 2005. cap. 9, p. 207-246.

MAPA, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Dispõe sobre o regulamento técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal. Instrução normativa nº46 de 6 de outubro de 2011.

MCGOVERN, R. J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. **Crop Protection**, v. 73, p. 78-92, 2015.

MUNDT, C. C. Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 27, p. 446-455, 2014.

POLAND, J. A.; BALINT-KURTI, P. J.; WISSER, R. J.; PRATT, R. C.; NELSON, R. J. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 21-29, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2011. ISBN 3-900051-07-0. Disponível em: URL <http://www.r-project.org/>. Acesso em: 9 jul. 2014.

REIS, A.; GIORDANO, L. D. B.; LOPES, C. A.; BOITEUX, L. S. Novel sources of multiple resistance to three races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in *lycopersicon* germplasm. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 4, p. 495-502, 2004.

REIS, A.; BOITEUX, L. B.; COSTA, H.; LOPES, C. A. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 on tomato in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 426-428, 2005.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Ocorrência da raça 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* em lavouras comerciais de tomate para mesa no Estado do Rio de Janeiro. **Horticultura Brasileira**, v. 25, n. 3, p. 451-454, 2007.

- ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Biological control of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by rhizobacteria. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 5, p. 423-430, 2013.
- ROCHA, F. Y. O.; OLIVEIRA, C. M.; SILVA, P. R. A.; MELO, L. H. V.; CARMO, M. G. F. C.; BALDANI, J. I. Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Applied Soil Ecology**, v. 120, p. 8-19, 2017.
- SANTOS, J. R. M. Methodology for screening tomato for *Fusarium* wilt. *Verticillium* wilt. gray leaf spot. Early blight and Septoria leaf blight. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE PROCESSING TOMATO, 1.; INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON TROPICAL TOMATO DISEASES, 1., 1996, Recife. **Proceedings...** Alexandria: ASHS: IPA. 1997. p. 164-166.
- SANTOS JÚNIOR, W. N.; CARVALHO, M. R. M.; CABRAL, C. S.; REIS, A. Seleção de híbridos e acessos de tomate para resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. Embrapa Hortaliças, 2009.19p.
- SAXENA, A.; CRAMER, C. S. Screening of onion seedlings for resistance against New Mexico isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. **Journal of Plant Pathology**, p. 199-202, 2009.
- SCOTT J. W.; JONES J. P. Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. **Euphytica**, v. 40 p. 49-53, 1989.
- SHANMUGAM, V.; KANOUIA, N. Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by plant growth-promoting rhizobacterial mixture. **Biological Control**, v. 57, n. 2, p. 85-93, 2011.
- SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, v. 11, p. 33-40, 1962.
- SOUZA, L. T.; MICHEREFF, S. J.; LARANJEIRA, D.; ANDRADE, D. E. G. T.; FERRAZ, E.; LIMA, G. S. A.; REIS, A. Reação de genótipos de tomateiro às raças 2 e 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Horticultura Brasileira**, v. 28, p. 102-106, 2010.
- SRIVASTAVA, R.; KHALID, A.; SINGH, U. S.; SHARMA, A. K. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. **Biological Control**, v. 53, p. 24-31, 2010.
- SRINIVASAN, K; GILARDI, G; GARIBALDI, A.; GULLINO, M. L. Bacterial antagonists from used rockwool soilless substrates suppress *Fusarium* wilt of tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 147-154, 2009.
- TAKKEN, F.; REP, M. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 11, n. 2, p. 309-314, 2010.
- VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; PAUL, P. A.; COSTA, H. Doenças causadas por fungo em tomate. In: ALVARENGA, M. A. R. **Tomate. Produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia**. 1 ed. Lavras MG : Editora Perfil, 2004. 400 p.

VAN DER PLANK, J. E. Plant disease: epidemic and control. **Academic Press, New York**, London, 1963. 342p.

WEBB, K. M.; DELGROSSO, S. J.; WEST, M. S.; FREEMAN, C.; BRENNER, T. Influence of environment, crop age and cultivar on the development and severity of *Fusarium* yellows in field-grown sugar beet. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 39, n. 1, p. 37-47, 2017.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- O patógeno, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (FOL) foi identificado em cultivares comerciais informadas como resistentes às raças 1 e 2 de FOL;
- A associação das técnicas variedades diferenciadoras de raças fisiológicas e sequenciamento gênico permitiu identificar a raça 3 de FOL como predominante em plantios comerciais de tomateiro na região de Nova Friburgo, RJ;
- Todas as cultivares utilizadas pelos produtores da região apresentam resistência completa (SI) à raça 1 e resistência completa (SI), ou parcial (AR e MR), a raça 2;
- A maioria das cultivares plantadas por agricultores familiares são suscetíveis à raça 3;
- As práticas de manejo adotadas na região contribuem para a disseminação e sobrevivência do patógeno e para seleção da raça 3;
- Foram identificados cinco acessos na Coleção de Germoplasma com resistência completa (SI) às raças 1 e 2 e nenhum acesso resistente à raça 3;
- O uso de escala de notas associado com a % de infecção vascular e parâmetros de desenvolvimento proporcionam maior confiabilidade na identificação de acessos de tomateiro resistentes a murcha-de-fusário.

7 ANEXOS

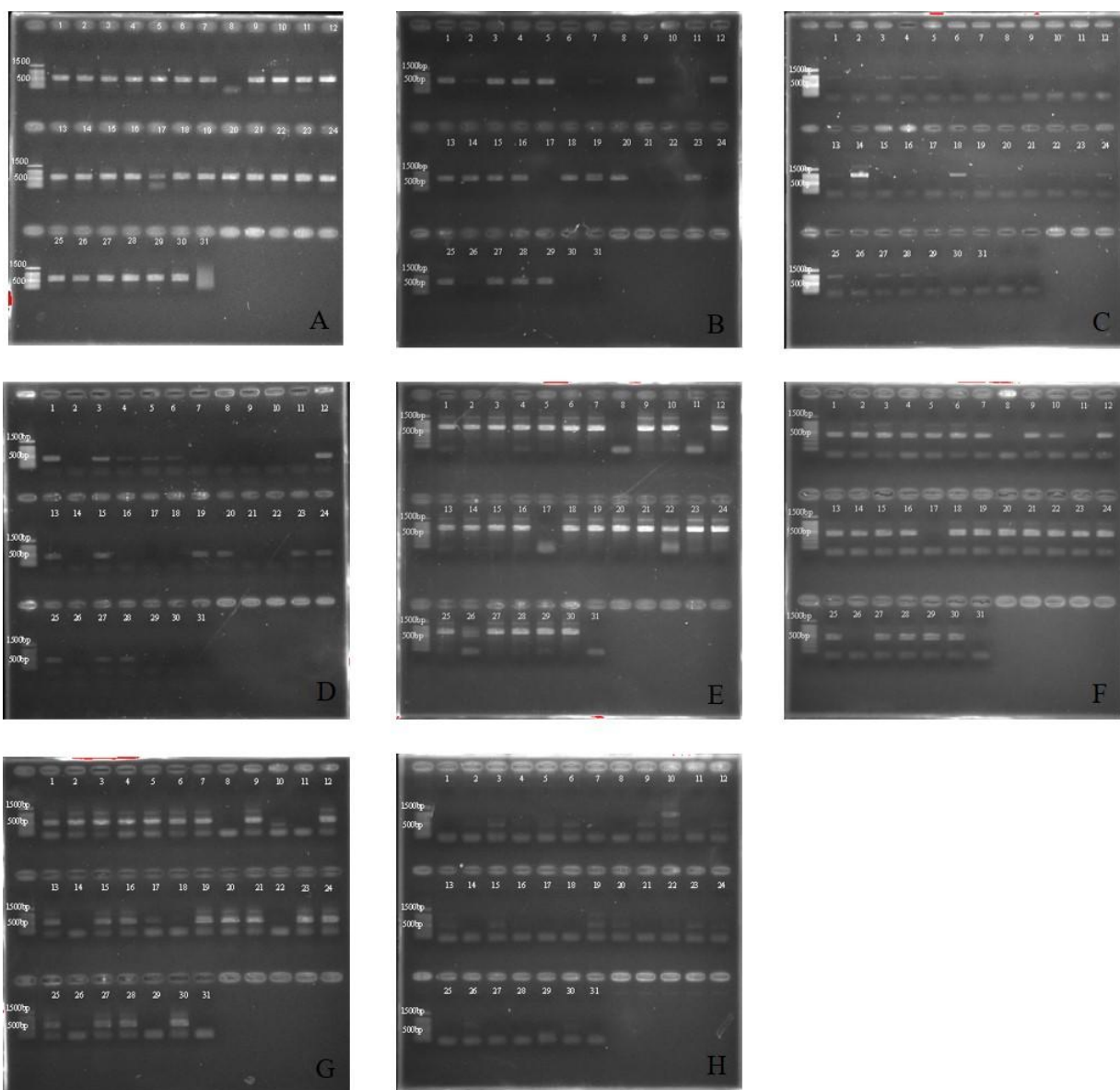


Figura anexo 1. A) Primer ITS 4 e ITS 5. B) Primer SIX3. Presença ou ausência de 608-bp do produto amplificado. C) Primer SIX4. Presença ou ausência de 967-bp do produto amplificado. D) SIX3-G121A-F2. Presença ou ausência de 429-bp do produto amplificado. E) Primer uni. Presença ou ausência de 670~672-bp do produto amplificado; F) Primer sp13. Presença ou ausência de 445-bp do produto amplificado. G) Primer sp23. Presença ou ausência de 518-bp do produto amplificado; H) Primer sprl. Presença ou ausência de 947 bp do produto amplificado. Marcador 100bp.

Legenda: Isolados: 1- FUS 0903; 2- FUS 0101; 3- FUS 0505; 4- FUS 2903; 5- FUS 1406; 6- FUS 1001; 7- FUS 0604; 8- FUS 2802; 9- FUS 3302; 10- FUS 0107; 11- FUS 1703; 12- FUS 2906; 13- FUS 0802; 14- MMBF 01/96; 15- FUS 1402; 16- FUS 0706; 17- FUS 1701; 18- MMBF 02/96; 19- FUS 1705; 20- FUS 1303; 21- FUS 1203; 22- FUS 0407; 23- FUS 1302; 24- FUS 0602; 25- FUS 0701; 26- FUS 1202; 27- FUS 1405; 28- FUS 3102; 29- MMBF 152/12; 30- FUS 0108 e; 31- Água.

Download ▾ GenBank Graphics

Fusarium oxysporum f. sp. *lycopersici* isolate FOL-MM10 secreted in xylem 3 (SIX3) gene, complete cds
Sequence ID: [GQ268957.1](#) Length: 492 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 492 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
909 bits(492)	0.0	492/492(100%)	0/492(0%)	Plus/Plus
Query 57	ATGCGTTTCCTTCTGCTTATAGCCATGTCATGACATGGGTTTGCTCTATTGCTGGGCTA	116		
Sbjct 1	ATGCGTTTCCTTCTGCTTATAGCCATGTCATGACATGGGTTTGCTCTATTGCTGGGCTA	60		
Query 117	CCTGTGGAAGATGCCGATTCACTGTGCGGTGAGCTCAAGGACGGGGTAACCCATATTGC	176		
Sbjct 61	CCTGTGGAAGATGCCGATTCACTGTGCGGTGAGCTCAAGGACGGGGTAACCCATATTGC	120		
Query 177	ATGTTTCCCGCCGCGCACGTCTTCTACTTCATTACTACGAGCTTCAGCACCGAACCT	236		
Sbjct 121	ATGTTTCCCGCCGCGCACGTCTTCTACTTCATTACTACGAGCTTCAGCACCGAACCT	180		
Query 237	CTGGGTTATGCTAGAATGTTACACAGAGACCCCTCCATATGAGCGGGCTGGCAATTCGGGA	296		
Sbjct 181	CTGGGTTATGCTAGAATGTTACACAGAGACCCCTCCATATGAGCGGGCTGGCAATTCGGGA	240		
Query 297	CTGAATCACCGCATTACGAACGAAAGTCGCGTTGGAGCCCTCCGCACTGTCTATTGATGTC	356		
Sbjct 241	CTGAATCACCGCATTACGAACGAAAGTCGCGTTGGAGCCCTCCGCACTGTCTATTGATGTC	300		
Query 357	GccccccGGACGGACACCAAGCCATCGCCAACTACGAGATCGAAGTCGTCGTATTCT	416		
Sbjct 301	GccccccGGACGGACACCAAGCCATCGCCAACTACGAGATCGAAGTCGTCGTATTCT	360		
Query 417	GTTGCAACACCTAATGCGGCTGGAGATTGCTTTCACACTGCACGCCTTAGTACCGGCTCT	476		
Sbjct 361	GTTGCAACACCTAATGCGGCTGGAGATTGCTTTCACACTGCACGCCTTAGTACCGGCTCT	420		
Query 477	CGAGGTCAGCCACAATCAGTTGGGATGCCGACGCTAGTTATACCTACTATCTTACTATC	536		
Sbjct 421	CGAGGTCAGCCACAATCAGTTGGGATGCCGACGCTAGTTATACCTACTATCTTACTATC	480		
Query 537	TCAGAGGATTGA	548		
Sbjct 481	TCAGAGGATTGA	492		

Figura anexo 2. Exemplo de resultado do alinhamento da região amplificada SIX3, para o isolado FUS 0903 coletado em Nova Friburgo, ao qual apresentou similaridade de 100% com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* FOL-MM10, raça 3.

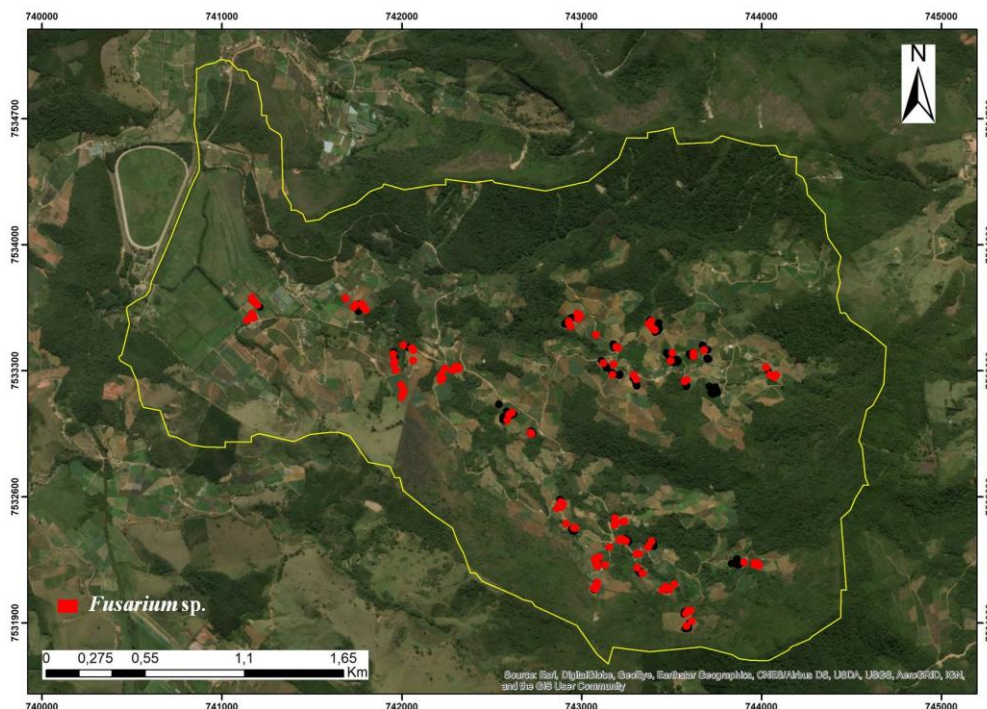


Figura anexo 3. Mapa representativo do número de plantas infectadas por *Fusarium* sp. identificados na região de Nova Friburgo, RJ.

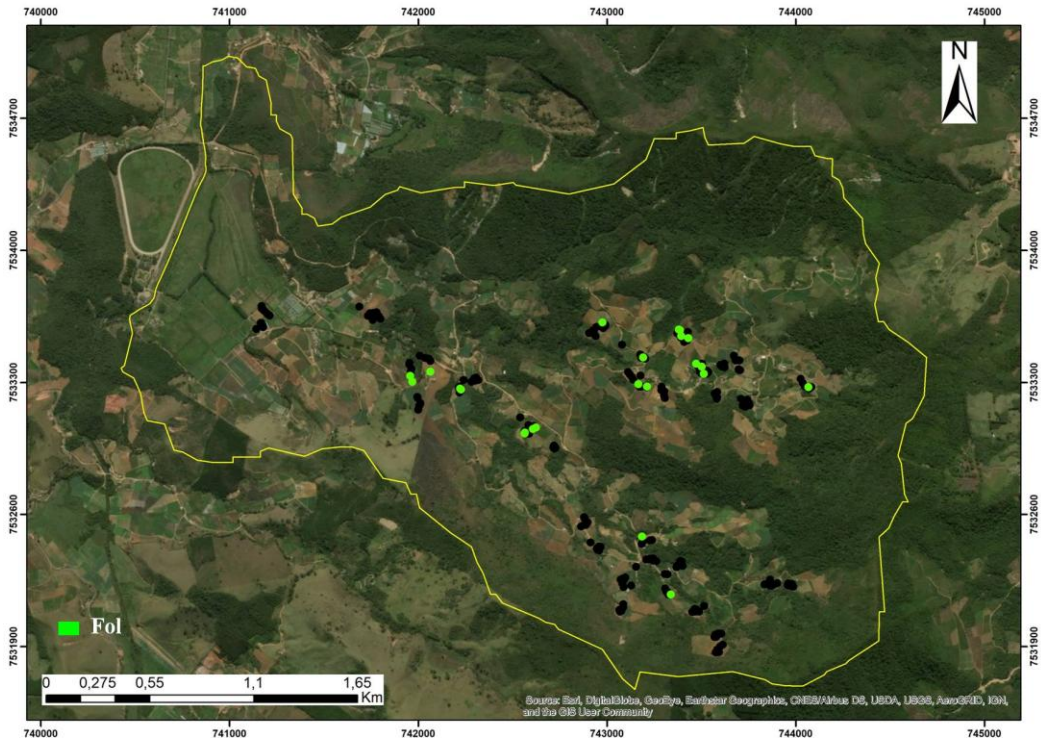


Figura anexo 4. Mapa representativo do número de plantas infectadas por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identificados na região de Nova Friburgo, RJ.

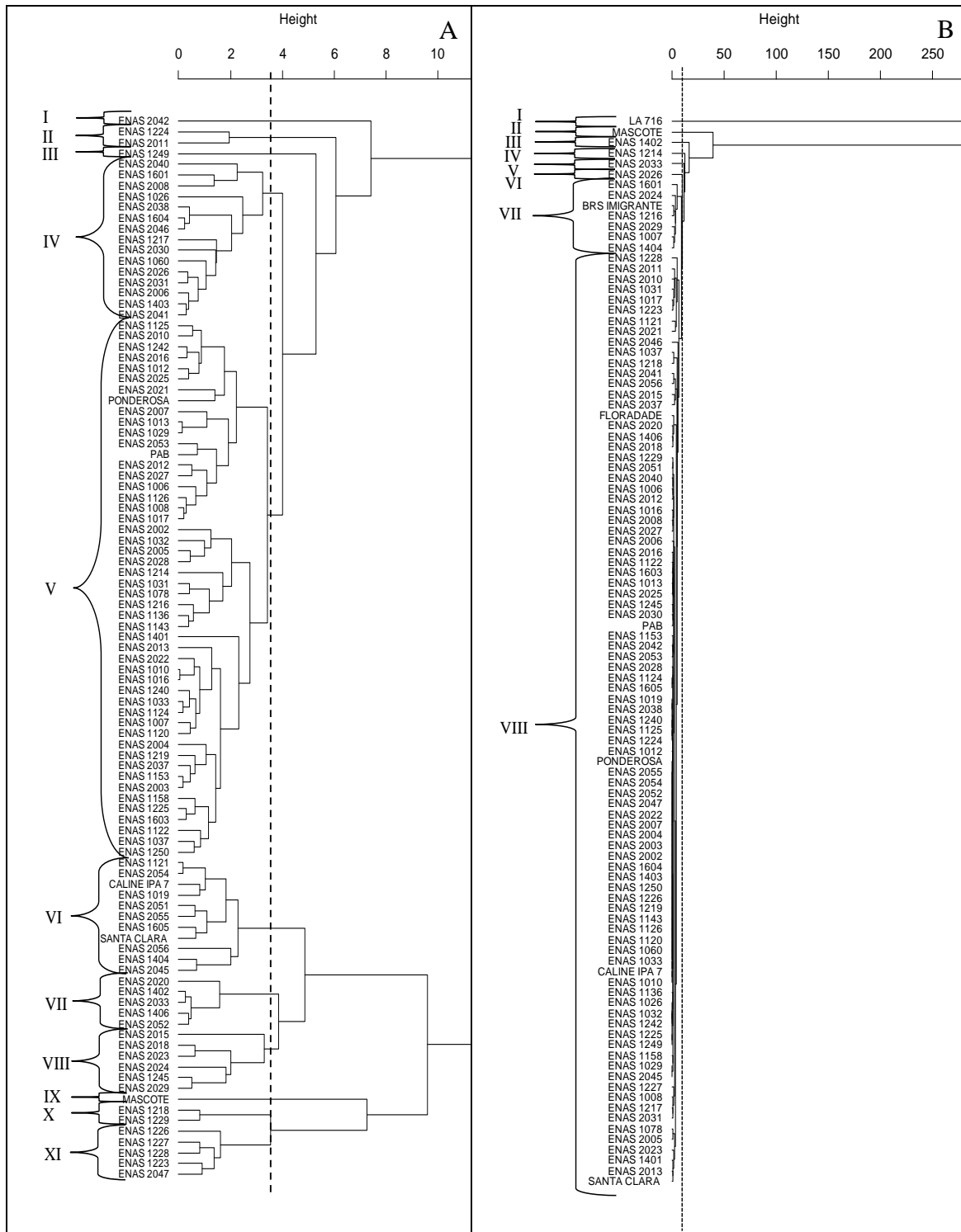


Figura anexo 5. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 99 e 102 genótipos de tomateiro, construído pelo método “UPGMA”, com base em seis caracteres, a partir da distância generalizada de Mahalanobis (D²). A) Raça 1 (MMBF 01/96) e B) Raça 3 (FUS 2903).

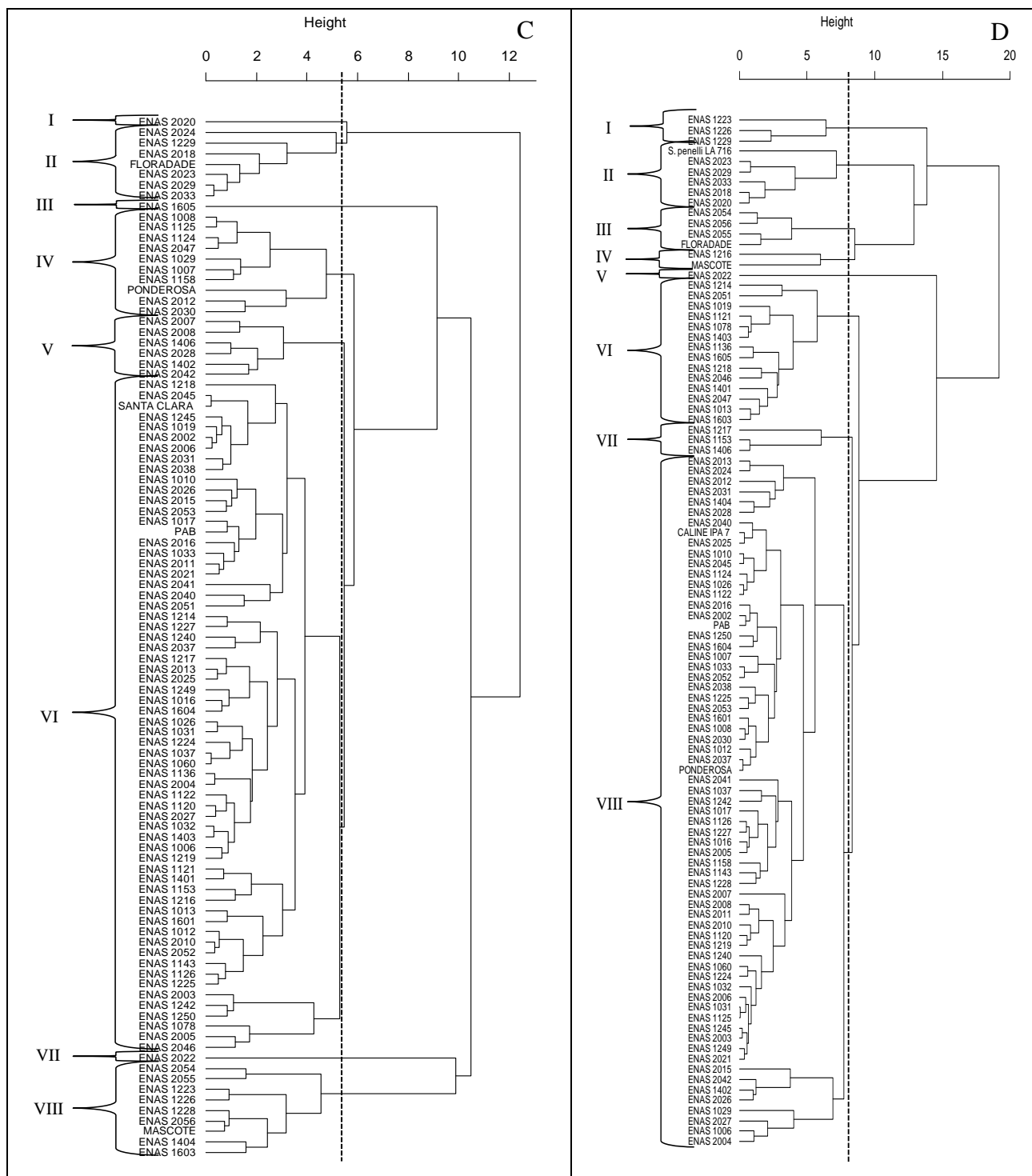


Figura anexo 6. Dendrograma de dissimilaridades genéticas entre 99 e 100 genótipos de tomateiro, construído pelo método “UPGMA”, com base em seis caracteres, a partir da distância generalizada de Mahalanobis (D^2). A) Raça 2 (MMBF 02/96) e B) Raça 2 (MMBF 152/12).



Figura anexo 7. Etapas do processo de inoculação. A) Produção de mudas de tomateiro; B) muda destacada da sementeira para lavagem e retirada do excesso de substrato aderido às raízes; C) corte da porção apical da raiz; D) imersão das plantas na suspensão de esporos; E) transplântio para tubetes e; F) adição da suspensão de esporos ao colo de cada planta com auxílio de um pipetador automático.



Figura anexo 8. Sintomas típicos da murcha-de-fusário em tomateiro causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. A e B) Murcha, amarelecimento e necrose nas folhas e; C) descoloração no sistema vascular.

Tabela anexo 1. Caracterização de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolados de tomateiros de propriedades agrícolas comerciais de Nova Friburgo, Rio de Janeiro e isolados controle sabidamente pertencentes às raças 1 (MMBF 01/96) e 2 (MMBF 02/96 e MMBF 152/12) (continua).

Código do Isolado	Cultivar Diferenciadora	Primer Universal	Sistema de Lievens et al. (2009)			Raça	Sistema de Hirano e Arie, (2006)				Raça	Genbank*		
			ITS	SIX3	SIX4		SIX3-G121A	G121A	uni	sp13			sp23	sp1
MMBF01/96	1		+	+	+	-		1	+	+	-	-	1	1
MMBF02/96	2		+	+	+	-		1	+	+	-	-	1	1
MMBF152/12	2		+	+	+	-		1	+	+	-	-	1	1
FUS 0101	NI		+	+	+	-		1	+	+	+	-	3	3
FUS 0505	3		+	+	+	+		3/1	+	+	+	-	3	3
FUS 0602	3		+	-	+	+		NI	+	+	+	-	3	3
FUS 0604	NI		+	+	-	-		2	+	+	+	-	3	3
FUS 0701	3		+	+	+	+		1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 0706	3		+	+	-	-		2	+	+	+	-	3	3
FUS 0802	3		+	+	+	+		1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 0806	NI		NA	NA	NA	NA			NA	NA	NA	NA		NA
FUS 0902	3		NA	NA	NA	NA			NA	NA	NA	NA		NA
FUS 0903	3		+	+	+	+		3/1	+	+	+	-	3	3
FUS 1001	3		+	-	-	+		3	+	+	+	-	3	3
FUS 1105	3		NA	NA	NA	NA			NA	NA	NA	NA		NA
FUS 1202	NI		+	-	-	-		NI	-	-	-	-	NI	3
FUS 1203	NI		+	-	-	-		NI	+	+	+	-	3	3
FUS 1301	3		NA	NA	NA	NA			NA	NA	NA	NA		NA
FUS 1302	3		+	+	+	+		1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 1303	3		+	+	+	+		1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 1402	3		+	+	-	+		3	+	+	+	-	3	3
FUS 1405	3		+	+	+	+		1/3	+	+	+	-	3	3

Tabela anexo 1. Continuação

FUS 1406	3	+	+	+	+	3/1	+	+	+	-	3	3
FUS 1701	3	+	-	-	-	NI	-	-	+	-	2	NA
FUS 1703	NI	+	-	-	-	NI	-	-	-	-	NI	NA
FUS 1705	3	+	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 2006	NI	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
FUS 2401	NI	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
FUS 2703	3	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
FUS 2804	NI	-	-	-	-	NI	-	-	-	-	NI	3
FUS 2903	3	+	+	+	+	3/1	+	+	+	-	3	3
FUS 2906	3	+	+	-	+	3	+	+	+	-	3	3
FUS 3102	3	+	+	+	+	1/3	+	+	+	-	3	3
FUS 3103	3	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
FUS 3302	3	+	+	-	-	2	+	+	+	-	3	3
FUS 0107	NI	+	-	-	-	NI	+	+	-	+	NI	NA
FUS 0108	NI	+	-	-	-	NI	+	+	+	-	3	3
FUS 0407	NI	+	-	+	-	NI	+	+	-	-	1	NA
FUS 3	NI	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
FUS 5	3	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
FUS 7	NI	NA	NA	NA	NA		NA	NA	NA	NA		NA
ÁGUA	NI	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-

* Classificação da raça por comparação com sequencias gênicas de raças de FOL caracterizadas e depositadas no Genbank (NCBI).

Tabela anexo 2. Análise de variância para porcentagem de infecção do sistema vascular (% I) para os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* isolados de tomateiros de Nova Friburgo, RJ.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		Infecção %*	Notas	Massa Fresca*	PMF*
Isolados	26	87.383448**	11.135705**	2.395234**	40.389917**
Cultivar	4	1369.504961**	198.380053**	19.13341**	449.504086**
Isolados*cultivar	104	19.504031**	2.503186**	0.865948**	22.027902**
Erro	821	2.346443	0.387267	0.234515	5.882487
CV (%)		19,97	17,57	20,21	29,93

*Dados transformados $\sqrt{x+1}$

Tabela anexo 3. Análise de variância para perda de massa fresca (MFR), redução no crescimento das mudas (RC) e porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) para o isolado MMBF 01/96 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, raça 1.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		NOTAS*	MFR	RC	PIV*
Cultivar	20	13.09620	7327.785140**	6269.949180**	82.695526**
Erro	122	0.084309	377.963115**	347.321526**	0.624936**
CV (%)		17,52	28,05	24,49	29,59

*Dados transformados $\sqrt{x+1}$

Tabela anexo 4. Análise de variância para perda de massa fresca (MFR), redução no crescimento das mudas (RC) e porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) para os isolados MMBF 02/96 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, raça 2.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		NOTAS*	MFR	RC	PIV*
Cultivar	20	0.799627**	3463.593869**	2669.797922 **	68.963758**
Erro	126	0.044935**	309.392744**	254.301614**	3.938205**
CV (%)		12,46	24,47	19,67	54,86

*Dados transformados $\sqrt{x+1}$

Tabela anexo 5. Análise de variância para perda de massa fresca (MFR), redução no crescimento das mudas (RC) e porcentagem de infecção do sistema vascular (PIV) para o isolado FUS 2903 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, raça 3.

Fonte de Variação	GL	Quadrado Médio			
		NOTAS	MFR*	RC*	PIV*
Cultivar	20	7.704762	25.290253**	26.912461**	49.411684**
Erro	126	0.385488	6.404562**	7.002379**	2.251103**
CV (%)		16,30	49,92	45,43	17,80

*Dados transformados $\sqrt{x+1}$

Tabela anexo 6. Validação cruzada realizada pela análise discriminante

Grupos	Nº de amostras dentro de cada grupo											Taxa de Erro	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Geral
2	119	122	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.87%
3	119	103	19	—	—	—	—	—	—	—	—	—	12.17%
4	102	17	103	19	—	—	—	—	—	—	—	—	9.85%
5	32	70	17	103	19	—	—	—	—	—	—	—	12.53%
6	32	70	17	69	34	19	—	—	—	—	—	—	13.21%
7	32	50	20	17	69	34	19	—	—	—	—	—	13.58%
8	18	14	50	20	17	69	34	19	—	—	—	—	13.28%
9	18	14	50	20	12	5	69	34	19	—	—	—	12.15%
10	18	14	50	20	12	5	54	15	34	19	—	—	11.15%
11	18	14	38	12	20	12	5	54	15	34	19	—	13.58%
12	14	4	14	38	12	20	12	5	54	15	34	19	10.39%

Tabela anexo 7. Questionário aplicado aos produtores de Nova Friburgo, RJ (continua).

Código da Amostra:

Município: Nova Friburgo	Data
Proprietário:	Local
Tamanho da Propriedade:	Assistência Técnica
Qualidade (Cultivar)	
Quantos mil pés de tomate	
Espaçamento	
Data do Transplante:	
Área Plantada	

Caracterização da propriedade

Há quanto tempo cultiva tomate nesta área:	
Data último plantio de solanácea neste talhão	
Quais: () tomate () batata () pimentão () pimenta () jiló () berinjela	
Quais foram os cultivos anteriores – último ano () ou dois anos ():	
Planta de cobertura ou adubação verde ()	Pousio ():
Qual espécie: Quando:	Quanto tempo:

Preparo do solo

<i>Implementos usados</i>	
() arado	() pessoal () comunitário
() grade	
() enxada rotativa	() faz limpeza prévia () não faz limpeza prévia
() encanteirador	

Prática de preparo e de conservação de solo

() cultivo em morro abaixo	() terraços
() cultivo em diagonal	() faixas de retenção
() aração e gradagem em nível	() cobertura do solo
() cultivo mínimo	() aterro – quando
() plantio direto	()

Fertilidade do solo

Análise de solo () sim () não	Quando:
Calcário (Calagem): () sim () não	Quando:
Quando:	Tipo de Calcário:
Fosfato de rocha () sim () não	Quando:
	Quando:
Adubação verde: () sim () não	Quando:
	Espécie

Cultivo da Tomate

Mudas () preparo na propriedade ou () viveirista
() bandeja de isopor () bandeja de plástico () copinho ()
() substrato comercial () substrato de preparo local
() transplante imediato () deposição na área até transplante
Água usada para irrigar as mudas:

Adubo de cova – (Adubação de plantio)

Esterco	Quantidade por cova
() cama de ave fresca (sem curtir)	
() cama de ave curtida	
() composto orgânico – qual?	
Adubo químico	

Adubo de rega (Adubação de cobertura no solo)

Produto	Quantidade por cova	Datas

Adubação foliar

Produto	Quantidade (concentração, volume)	Datas

Controle do mato

() uso de herbicida pré- plantio - Produto/dose:	() uso de herbicida pós- plantio - Produto/dose:
() mulching	
() cultivador () limpeza do implemento () não limpeza	
() enxada () limpeza do implemento () não limpeza	
() não fez amontoa () fez amontoa - quando	

Irrigação

() aspersão () gotejamento () mangueira	Origem da água
Dificuldades..	() Cisterna () Poço - Localização
	() Mina ou nascente () Rio - Localização

Tabela anexo 7. Continuação.

Condução das plantas		
<input type="checkbox"/> limitação do número de hastes por planta – quantas? <input type="checkbox"/> condução vertical <input type="checkbox"/> condução em cerca cruzada <input type="checkbox"/> sistema mexicano <input type="checkbox"/>		
Pragas		
<input type="checkbox"/> Lagarta rosca <input type="checkbox"/> Grilo <input type="checkbox"/> Mosca Branca <input type="checkbox"/> Pulgão <input type="checkbox"/> Trips	<input type="checkbox"/> Larva minadora <input type="checkbox"/> Traça <input type="checkbox"/> Broca pequena <input type="checkbox"/> Broca grande <input type="checkbox"/>	
Métodos de controle: <input type="checkbox"/> Químico <input type="checkbox"/> ensacamento <input type="checkbox"/> Outro		
Controle químico/produto	Quantidade	Frequencia
1		
2		
3		
Doenças		
De solo <input type="checkbox"/> cano d'água <input type="checkbox"/> murcha <input type="checkbox"/> verticilium <input type="checkbox"/> <i>Fusarium</i> <input type="checkbox"/> murchadeira (Ralstonia) <input type="checkbox"/> não sabe	<input type="checkbox"/> Podridão de colo e raiz <input type="checkbox"/> Nematóide <input type="checkbox"/> canela preta <input type="checkbox"/> cancro da haste	
Produtos usados no controle	Quantidade	Datas
1		
2		
3		
4		
De copa		
<input type="checkbox"/> viroses Quais	<input type="checkbox"/> bactérias <input type="checkbox"/> pinta bacteriana <input type="checkbox"/> mancha bacteriana <input type="checkbox"/> podridão mole <input type="checkbox"/> cancro bacteriano	
<input type="checkbox"/> fungos	<input type="checkbox"/> requeima <input type="checkbox"/> pinta preta	<input type="checkbox"/> mancha de estenfilio <input type="checkbox"/> oídio <input type="checkbox"/> outra
Produtos usados no controle	Quantidade	Datas
1		
2		
3		
Colheita		
Início da colheita		
Previsão para as últimas colheitas		
Número de cachos por planta		
Intervalo de colheitas	<input type="checkbox"/> Uma vez por semana <input type="checkbox"/> duas vezes por semana	
Produtividade esperada (úmero de caixas de 22Kg)		
Embalagem e peso médio	<input type="checkbox"/> caixa K <input type="checkbox"/> caixa plástica retornável <input type="checkbox"/> saco	
Manejo do resíduos no campo		
Próxima cultura		
Observações:		

Tabela anexo 8. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 99 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.

RAÇA 1 (MMBF 01/96)						
	Df	Wilks	approx F	numDf	denDf	Pr(>F)
Accession	98	0,062	3,512	588	3495,9	2,2E-16 ***
Residuals	587					

Coeficiente de Correlação COFENÉTICO (CCC)				
	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,652	0,714	0,746	0,714

Consistência via Mantel (Mantel statistic r:)				
	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,652	0,714	0,746	0,714
Signif:	0,001	0,001	0,001	0,001

Tabela anexo 9. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 99 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.

RAÇA 2 (MMBF 02/96)						
	Df	Wilks	approx F	numDf	denDf	Pr(>F)
Accession	98	0,057	3,048	588	2926,8	2,2E-16 ***
Residuals	492					

Coeficiente de Correlação COFENÉTICO (CCC)				
	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,702	0,608	0,718	0,659

Consistência via Mantel (Mantel statistic r:)				
	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,702	0,608	0,718	0,659
Signif:	0,001	0,001	0,001	0,001

Tabela anexo 10. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 100 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 2 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.

RAÇA 2 (MMBF 152/12)						
	Df	Wilks	approx F	numDf	denDf	Pr(>F)
Accession	99	0,029	4,81	594	3531,9	2,2E-16 ***
Residuals	593					

Coeficiente de Correlação COFENÉTICO (CCC)

	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,721	0,569	0,762	0,708

Consistência via Mantel (Mantel statistic r:)

	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,721	0,569	0,762	0,708
Signif:	0,001	0,001	0,001	0,001

Tabela anexo 11. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) de 6 variáveis em 102 acessos de tomate cultivados em casa de vegetação inoculados com raça 3 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Consistência do padrão de agrupamento proporcionado pelas técnicas do Vizinho mais próximo, Vizinho mais distante, UPGMA e Ward em relação à distância de Mahalanobis (D2), para variáveis quantitativas, em função do coeficiente de correlação cofenética, e consistência via Mantel.

RAÇA 3 (FUS 2903)						
	Df	Wilks	approx F	numDf	denDf	Pr(>F)
Accession	101	0,033	3,787	707	4247,1	2,2E-16 ***
Residuals	612					

Coeficiente de Correlação COFENÉTICO (CCC)

	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,995	0,978	0,997	0,880

Consistência via Mantel (Mantel statistic r:)

	Single linkage clustering	Complete linkage clustering	Average clustering	Ward clustering
D2	0,995	0,978	0,997	0,880
Signif:	0,001	0,001	0,001	0,001

Tabela anexo 12. Análise química do solo da região de desenvolvimento das raízes das plantas de tomateiro coletadas para avaliação quanto a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Nova Friburgo, 2015.

	pH	Al	Ca	Mg	Corg.	V	m	P	K
	águaCmol _c /dm ³%.....		mg/L.....	
0-20 cm	5,57	0,11	2,58	0,99	1,12	45,84	2,79	224,47	290,66

Tabela anexo 13. Informações quanto ao código, grupo e origem da coleção de Germoplasma do Departamento de Fitotecnia da UFRRJ utilizada no trabalho de tese (continua).

Número	Código	Grupo	Origem
1.	ENAS 1006	Cereja	França
2.	ENAS 1007	Cereja	França
3.	ENAS 1008	Cereja	França
4.	ENAS 1010	Cereja	França
5.	ENAS 1012	Cereja	França
6.	ENAS 1013	Cereja	Espírito Santo
7.	ENAS 1016	Cereja	Seropédica/UFRRJ
8.	ENAS 1017	Cereja	Seropédica/UFRRJ
9.	ENAS 1019	Cereja	França
10.	ENAS 1026	Cereja	França
11.	ENAS 1029	Cereja	França
12.	ENAS 1031	Cereja	França
13.	ENAS 1032	Cereja	Si
14.	ENAS 1033	Cereja	Si
15.	ENAS 1037	Cereja	Si
16.	ENAS 1060	Cerejão	Si
17.	ENAS 1078	Cereja	Si
18.	ENAS 1120	Cerejão	Si
19.	ENAS 1121	Cereja	Si
20.	ENAS 1122	Cereja	Si
21.	ENAS 1124	Cereja	Si
22.	ENAS 1125	Cereja	Si
23.	ENAS 1126	Cerejão	Si
24.	ENAS 1136	Cereja	Si
25.	ENAS 1143	Cereja	Si
26.	ENAS 1153	Cereja	Si
27.	ENAS 1158	Cereja	Si
28.	ENAS 1214	Cereja	Campinas-SP
29.	ENAS 1216	Cereja	Campinas-SP
30.	ENAS 1217	Cereja	Campinas-SP
31.	ENAS 1218	Cereja	Campinas-SP
32.	ENAS 1219	Cereja	Campinas-SP
33.	ENAS 1223	Cereja	Campinas-SP
34.	ENAS 1224	Cereja	Campinas-SP
35.	ENAS 1225	Cereja	Campinas-SP
36.	ENAS 1226	Cereja	Campinas-SP
37.	ENAS 1227	Cereja	Campinas-SP

Tabela anexo 13. Continuação.

38.	ENAS 1228	Cereja	Campinas-SP
39.	ENAS 1229	Cereja	Campinas-SP
40.	ENAS 1240	Cerejão	Seropédica/UFRRJ
41.	ENAS 1242	Cerejão	Seropédica/UFRRJ
42.	ENAS 1245	Cereja	Seropédica/UFRRJ
43.	ENAS 1249	Cereja	Si
44.	ENAS 1250	Cereja	Si
45.	ENAS 1401	Cereja	EUA
46.	ENAS 1402	Cereja	Si
47.	ENAS 1403	Cereja	Si
48.	ENAS 1404	Cereja	Si
49.	ENAS 1406	Cereja	Si
50.	ENAS 1601	Cerejão	Si
51.	ENAS 1603	Cerejão	Si
52.	ENAS 1604	Cereja	Si
53.	ENAS 1605	Cerejão	Si
54.	ENAS 2002	Si	EUA
55.	ENAS 2003	Salada	EUA
56.	ENAS 2004	Salada	EUA
57.	ENAS 2005	Salada	EUA
58.	ENAS 2006	Salada	França
59.	ENAS 2007	Salada	EUA
60.	ENAS 2008	Salada	Si
61.	ENAS 2010	Salada	Si
62.	ENAS 2011	Salada	Si
63.	ENAS 2012	Salada	Si
64.	ENAS 2013	Salada	Si
65.	ENAS 2015	Salada	Si
66.	ENAS 2016	Salada	Si
67.	ENAS 2018	Salada	Si
68.	ENAS 2020	Salada	Si
69.	ENAS 2021	Salada	Si
70.	ENAS 2022	Salada	Si
71.	ENAS 2023	Salada	Si
72.	ENAS 2024	Salada	Si
73.	ENAS 2025	Salada	Si
74.	ENAS 2026	Salada	Si
75.	ENAS 2027	Salada	Si
76.	ENAS 2028	Salada	Si
77.	ENAS 2029	Salada	Si
78.	ENAS 2030	Salada	Si
79.	ENAS 2031	Salada	Si
80.	ENAS 2033	Salada	Si
81.	ENAS 2037	Salada	Si
82.	ENAS 2038	Salada	Si
83.	ENAS 2040	Salada	Si
84.	ENAS 2041	Salada	Si
85.	ENAS 2042	Salada	Si

Tabela anexo 13. Continuação.

86.	ENAS 2045	Salada	Si
87.	ENAS 2046	Salada	Si
88.	ENAS 2047	Salada	Si
89.	ENAS 2051	Italiano	Si
90.	ENAS 2052	Italiano	Si
91.	ENAS 2053	Italiano	Si
92.	ENAS 2054	Italiano	Si
93.	ENAS 2055	Italiano	Si
94.	ENAS 2056	Italiano	Si
95.	PAB	Cereja	São Paulo
96.	Mascote	Cereja	Empresa Agristar
97.	BRS Imigrante	Salada	Embrapa Hortaliças

Si: Sem informação.