

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA FLORESTAL**

**PATÓGENOS EM SEMENTES DE *PINUS* SPP. –
ÊNFASE EM *LASIODIPLODIA* SP. E *FUSARIUM* SPP.**

TESE DE DOUTORADO

Caciara Gonzatto Maciel

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**PATÓGENOS EM SEMENTES DE *PINUS* SPP. – ÊNFASE EM
LASIODIPLODIA SP. E *FUSARIUM* SPP.**

Caciara Gonzatto Maciel

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de concentração em Silvicultura, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora em Engenharia Florestal**.

Orientador: Profa. Dra. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Maciel, Caciara Gonzatto
Patógenos em sementes de Pinus spp. - ênfase em
Lasiodiplodia sp. e Fusarium spp. / Caciara Gonzatto
Maciel.-2016.
73 f.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2016

1. Controle biológico 2. Patologia de sementes 3.
Sementes florestais 4. EF1 - 945; I. Muniz, Marlove
Fátima Brião II. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Caciara Gonzatto Maciel. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: caciaraconzatto@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

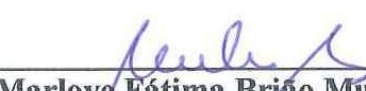
A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de Doutorado

**PATÓGENOS EM SEMENTES DE *PINUS* SPP. – ÊNFASE EM
LASIODIPLODIA SP. E *FUSARIUM* SPP.**

elaborada por
Caciara Gonzatto Maciel

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutora em Engenharia Florestal

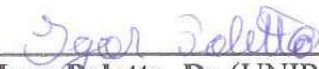
COMISSAO EXAMINADORA:



Marlove Fátima Brião Muniz, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Lia Rejane Silveira Reiniger, Dra (UFSM)



Igor Poletto, Dr.(UNIPAMPA)



Gersa Pauli Kist Steffen, Dra.(FEPAGRO)



Cândida Elisa Manfio, Dra. (UNICRUZ)

Santa Maria, 24 de fevereiro de 2016.

Dedicatória

Aos meus pais, Carlos e Leonilda, pelo amor de sempre.

RESUMO

Tese de Doutorado
Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

PATÓGENOS EM SEMENTES DE *PINUS* SPP. – ÊNFASE EM *LASIODIPLODIA* SP. E *FUSARIUM* SPP.

AUTORA: CACIARA GONZATTO MACIEL
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Data e local da defesa: Santa Maria, 24 de fevereiro de 2016.

O gênero *Pinus* destaca-se no setor florestal, especialmente na região Sul do Brasil, pela produção de madeira e celulose. Entretanto, suas sementes apresentam vulnerabilidade sanitária e doenças causadas por fungos são ocorrências decisivas na fase de produção de mudas nos viveiros. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de *Pinus* spp. oriundas de diferentes procedências; identificar morfológicamente e molecularmente os isolados fúngicos associados as sementes; avaliar o potencial patogênico desses fungos; e testar a eficiência de agentes biocontroladores no tratamento das sementes. Para a caracterização inicial das sementes foram utilizados os testes de germinação e sanidade, avaliando-se quatro lotes e as amostras foram compostas por 400 sementes, para cada teste. A caracterização morfológica dos isolados fúngicos foi realizada com base em chaves específicas para os gêneros *Fusarium* e *Lasiodiplodia*, já para a identificação molecular, foram sequenciadas as regiões ITS e fator de alongação. O teste de patogenicidade consistiu na inoculação das sementes de *Pinus* via contato com a cultura fúngica do patógeno, sendo o substrato utilizado areia esterilizada com o teste mantido em sala de germinação (25 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 h) durante 45 dias. Para os testes de biocontrole foram utilizados produtos comerciais à base de *Trichoderma* e *Bacillus* e um isolado de *Bacillus* obtido das próprias sementes de *Pinus*. O controle *in vitro* foi realizado pelo método de confronto pareado de culturas (antagonista x patógeno) e o teste *in vivo* foi desenvolvido em condições de casa de vegetação, durante 60 dias; as variáveis avaliadas foram emergência, diâmetro do colo, peso fresco e seco de mudas. O percentual de germinação dos lotes foi superior a 70%. Os gêneros fúngicos identificados nas sementes foram: *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Com base nas características morfológicas e moleculares identificaram-se as espécies *Fusarium oxysporum*, *F. verticillioides* e *Lasiodiplodia theobromae* como patogênicas a espécie em estudo, causando *damping-off* de pré e pós-emergência. Os agentes antagonistas mostraram potencial de controle *in vitro* sobre *F. oxysporum*, *F. verticillioides* e *L. theobromae* e quando confrontados *in vivo* com *L. theobromae* não interferiram no desenvolvimento das mudas, até os 60 dias de condução do teste.

Palavras-chave: Controle biológico. Patologia de sementes. Sementes florestais. EF1 – α .

ABSTRACT

Doctorate Thesis
Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

PATHOGENS IN *PINUS* SPP. SEEDS. - EMPHASIS ON *LASIODIPLODIA* SP. AND *FUSARIUM* SPP.

AUTHOR: CACIARA GONZATTO MACIEL

ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ

Place and Date of the defense: Santa Maria, February 24th, 2016.

The genus *Pinus* is highlight in the forestry sector, especially in southern Brazil, by production of wood and cellulose. However, their seeds are vulnerable to attack by fungi causing diseases in nurseries. The present study aims to evaluate the physiological and sanitary quality of *Pinus* spp. seeds. from different origins; morphological and molecular identification of fungal species isolated from seeds of *Pinus* sp.; evaluate the pathogenic potential these fungi; and testing the efficacy of biocontrol agents for the treatment of seeds. For initial characterization of seed were evaluated germination and sanity tests. Four lots were utilized and samples were composed of 400 seeds for each test. The morphological characterization of the fungal isolates was accomplished based on specific keys to the genera *Fusarium* and *Lasiodiplodia*. For the molecular identification, ITS region and elongation factor, were sequenced. The pathogenicity test consists of the inoculation of the pine seeds by contact with a fungal culture of the pathogen, the substrate was sterilized sand, the test was kept in a growth room (25 ± 3 °C and photoperiod of 12 h) during 45 days. For biocontrol tests were used commercial products based on *Trichoderma* and *Bacillus*; and an isolated *Bacillus* themselves obtained from pine seeds. The *in vitro* control was conducted by direct confrontation between antagonist and pathogen. The *in vivo* test was carried out in conditions of vegetation for 60 days, the variables evaluated were emergence, stem diameter, fresh weight and dry seedling. The germination percentage of lots was higher 70%. The fungal genera associated with seeds were: *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma*. Based on morphological and molecular characteristics identified the species *F. oxysporum*, *F. verticillioides* and *Lasiodiplodia theobromae* as pathogenic species to *Pinus* spp., causing pre and post-emergence damping-off. The antagonists show control potential of *F. oxysporum*, *F. verticillioides* and *Lasiodiplodia theobromae* *in vitro*. *In vivo* tests does not interfere with the development of the seedlings, until the 60 days of test.

Keywords: Biocontrol. Seeds pathology. Forest seeds. EF1 – α .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

- Figure 1** - Morphological characterization of *Lasiodiplodia theobromae*. PDA (A); paraphyses (B); immature hyaline conidia and mature conidia (C); mature conidia, dark-walled, one-septate (D). Scale bars = 10 µm.....23
- Figure 2** - Phylogenetic dendrogram based on the neighbor-joining method from the DNA sequences of the ITS region. The numbers on the branches indicate the percentage of bootstrap replications of the analysis in which the repeats were observed (1000 replications)24
- Figure 3** - Pathogenicity test of *Lasiodiplodia theobromae* in *Pinus* sp. seeds. Damping-off in *P. elliottii* (A); damping-off pre-emergence in *P. elliottii* (B) and reproductive structures of the pathogen in seedlings of *P. taeda* (C).....25

ARTIGO 2

- Figure 1** - Symptoms post-emergence observed in seedlings of *Pinus* sp. (A, B and C); and control (D).....38
- Figure 2** - Phylogenetic dendrogram based on neighbor-joining method from the DNA sequences of the ITS region (A) and 1 α - Elongation factor (B). The numbers on the branches indicate the percentage of repetitions of the bootstrap analysis in which the repeats were observed (1000 repetitions). * Isolates of *Fusarium* spp. obtained in this study41
- Figure 3** - Regression analysis to the colony diameter of *F. verticillioides* and *F. oxysporum* (F1UFMS and F2UFMS) on PDA incubated at 25 °C and photoperiod 12 hours43
- Figure 4** - Morphological characterization of *Fusarium* sp. A) *In vitro* culture on PDA of *Fusarium oxysporum* (F2UFMS); C) Macroconidia and microconidia of *F.oxysporum* (F2UFMS); B) *In vitro* culture on PDA of *Fusarium verticillioides* (F1UFMS); D) Macroconidia and microconidia of *F. verticillioides* (F1UFMS)43

ARTIGO 3

- Figura 1.** Confronto direto dos agentes antagonistas com o patógeno, *Lasiodiplodia theobromae*54

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Isolates, origin, date and accession number of isolates of <i>L. theobromae</i> . Santa Maria, 2013.....	17
Table 2 - Health characteristics of seed lots of <i>Pinus</i> sp. used in the study. Santa Maria, 2013	20
Table 3 - Morphological characteristics of isolates <i>Lasiodiplodia</i> sp. obtained from seeds of <i>Pinus</i> sp. Santa Maria, 2013	22
Table 4 - Mean values of speed of emergence index (SEI), emergency (E), normal seedlings (NS), abnormal seedlings (AS) and non-germinated seeds (NGS) of <i>Pinus</i> sp. after inoculation with <i>Lasiodiplodia</i> sp. Santa Maria, 2013	26

ARTIGO 2

Table I - Details of isolates <i>Fusarium</i> spp. utilized in the study.....	34
Table II - Mean values of speed of emergence index (SEI), emergency (E), non-germinated seeds (NGS) and symptomatic seedlings (SS) of seeds of <i>Pinus</i> sp. after inoculation with <i>Fusarium</i> sp.....	39
Table III - Morphological characteristics of the <i>Fusarium</i> sp. obtained of seeds from <i>Pinus</i> sp.....	42

ARTIGO 3

Tabela 1. Características de isolados patogênicos a <i>Pinus</i> sp. utilizados no presente estudo.....	50
Tabela 2. Características dos produtos/isolado testados.....	50
Tabela 3. Crescimento micelial e porcentagem de inibição de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> em cultivo pareado com <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Bacillus</i> sp., <i>in vitro</i> , após cinco dias de incubação (25 ± 2 °C – fotoperíodo de 12 h)	53
Tabela 4. Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de <i>Pinus elliottii</i> , através das variáveis: emergência (E), diâmetro do colo (DC), comprimento de parte aérea (PA), comprimento de parte radicular (PR), massa verde (MV) e massa seca (MS).....	55
Tabela 5. Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de <i>Pinus taeda</i> , através das variáveis: emergência (E), diâmetro do colo (DC), comprimento de parte aérea (PA), comprimento de parte radicular (PR), massa verde (MV) e massa seca (MS).....	55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	10
Artigo 1 - Maciel, C.G.; Muniz, M.F.B.; Mezzomo, R.; Reiniger, L.R.S. <i>Lasiodiplodia theobromae</i> associated with seeds of <i>Pinus</i> spp. originated from the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. Scientia Forestalis, v. 47, n. 107, 2015.	14
Resumo	14
Introduction	15
Materials and methods	16
Results and discussion	20
Conclusion	27
Acknowledgments	27
References	27
Artigo 2 - Morphological and molecular characterization of <i>Fusarium oxysporum</i> and <i>Fusarium verticillioides</i> associated with damping-off in <i>Pinus</i> spp.	31
Abstract	31
Resumo	31
Introduction	32
Material and methods	33
Results and discussion	37
Conclusion	44
Acknowledgment	44
References	44
Artigo 3 - CONTROLE BIOLÓGICO DE <i>LASIODIPLODIA THEOBROMAE</i> ASSOCIADA A SEMENTES DE <i>PINUS</i> SP.	49
Resumo	49
Introdução	49
Material e métodos	50
Resultados e discussões	53
Conclusões	56
Agradecimentos	56
Referências bibliográficas	56
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	69

INTRODUÇÃO

A produção de madeira através de florestas plantadas visa substituir a exploração das florestas naturais. No Brasil, as principais espécies usadas em reflorestamentos são dos gêneros *Eucalyptus*, *Pinus* e *Acacia*, sendo que os plantios florestais do gênero *Pinus* predominam nas regiões Sul e Sudeste, visto que esta conífera adapta-se melhor em regiões de clima frio.

A produção de mudas de *Pinus* para abastecer o setor florestal é comumente realizada via sementes e a qualidade das mudas que são transplantadas para o campo depende do processo de produção no viveiro, a qual está diretamente relacionada às características fisiológicas, sanitárias, físicas e genéticas do lote de sementes utilizado. A semente pode atuar como vetor de patógenos, em especial de fungos, podendo transmiti-los para as plântulas e afetando as fases iniciais de pré e pós-emergência.

O gênero *Fusarium* vem sendo relatado como um dos patógenos associados a perdas nos viveiros produtores de mudas de pinus, em função de sua rápida disseminação e capacidade de infecção. A semente é um dos principais vetores de disseminação da doença causada por esse gênero fúngico (LANDERAS et al., 2005; WINGFIELD et al., 2008). Relatos da ocorrência desse patossistema foram feitos por Viljoen et al. (1997), que observaram *F. subglutinans* causando podridão radicular em *P. patula* na África do Sul; Lori e Salermo (2003), que identificaram as espécies *F. solani*, *F. verticillioides* (= *F. moniliforme*), *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. incarnatum* (= *F. pallidoroseum* = *F. semitectum*), *F. equiseti* e *F. acuminatum* em dois lotes de sementes oriundos da Argentina; Landeras et al. (2005) e Wingfield et al. (2008), que registraram *F. circinatum* associado ao “*pich canker*” responsável pelo *damping-off* de plântulas de pinus em viveiro; Lazreg et al. (2013; 2013a), que relataram *F. acuminatum* e *F. redolens* causando *damping-off* em *Pinus halepensis* no norte da África; Martín-Pinto, Pajares e Díez (2008), que verificaram redução no potencial germinativo e aumento na mortalidade de plântulas de *P. nigra*, em função de *F. verticillioides* e *F. oxysporum* na Espanha. No Brasil, Krugner et al. (1970) associaram os sintomas de murcha e secamento apical em mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* ao ataque da espécie *Fusarium oxysporum*; Auer et al. (2001) identificaram *Fusarium oxysporum* causando *damping-off* em plântulas de *Pinus elliottii*; Krugner e Auer (2005) relatam o gênero *Fusarium*, juntamente com *Cylindrocladium*, *Phytium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora* como potenciais causadores de *damping-off* em viveiros de pinus; Grigoletti Júnior e Auer (2006)

verificaram sintomas de murcha e secamento de mudas em *Pinus taeda* de dois a cinco meses de idade, associados ao gênero *Fusarium*, sendo os sintomas considerados reflexos, uma vez que o fungo ataca o sistema radicular; Maciel et al. (2013) constataram *F. sambucinum* como responsável por perdas de plântulas no viveiro e redução no peso fresco e seco de plântulas de *P. elliotii*; Pfenning et al. (2014), identificaram *F. circinatum* em mudas de *Pinus taeda*, causando murcha e morte de plântulas, no Estado de Santa Catarina.

Lasiodiplodia sp. também é um gênero fúngico com potencial para infecção de sementes de coníferas, relatado causando redução na viabilidade das sementes de *Pinus elliotii* na África do Sul (CILLIERS et al., 1993) e nos Estados Unidos da América (FRAEDRICH; MILLER e ZARNOCH, 1994). Esse patógeno é identificado, na maioria das vezes, colonizando os tecidos internos da semente. No Brasil, *Lasiodiplodia* sp. está associado a danos em frutíferas como *Mangifera indica* (SHAHBAZ et al., 2009); *Malpighiae marginata* (LIMA et al., 2012); *Cocus nucifera*; *Persea americana*, *Annona muricata*, *Spondias tuberosa* e *Carica papaya* (LIMA et al., 2013); *Carya illinoensis* (POLETTTO et al., 2016).

A identificação de espécies fúngicas é feita, tradicionalmente, com base na morfologia do fungo, o que constitui uma tarefa detalhista e que pode gerar controvérsias devido à variabilidade das características fenotípicas utilizadas para a classificação taxonômica dentro dos gêneros. Porém, o uso da reação da polimerase em cadeia (PCR) tem auxiliado na identificação precisa e eficaz dos microrganismos em nível de espécie (SCHILLING et al., 1996; GALE, 2003), técnica essa que atua como uma ferramenta complementar ao processo de caracterização morfológica, minimizando os erros da identificação. Diferentes regiões do DNA podem ser utilizadas para identificação, tais como 'Internal Transcribed Spacer' (ITS), beta - tubulina e fator de alongação 1- α , entre outras. Para Oliveira et al. (2011), todas elas apresentam vantagens e desvantagens em relação ao seu uso, seja pela dimensão dos fragmentos amplificados, pela facilidade de amplificação, ou pela variação ao nível das sequências, intra e inter - específico.

A identificação precisa em nível de espécie é fundamental para direcionar quais serão as alternativas de controle adotadas. Devido à característica cosmopolita e de fácil proliferação do *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp., deve-se dar ênfase às técnicas que minimizem o inóculo presente na semente e melhorem as condições do substrato para desenvolvimento da plântula. Em função das restrições do uso de fungicidas e os cuidados necessários com o meio ambiente, o uso do tratamento biológico vem ganhando destaque. Porém, ainda são necessários estudos para viabilizar as técnicas de aplicação e os

microrganismos com potencial para esse fim. Em levantamento realizado por Bettioli et al. (2012), foram organizadas informações técnicas de 135 produtos biológicos atuantes no controle de microrganismos, destes, apenas dois são registrados para espécies florestais: Rotstop[®] - à base do fungo *Phlebiopsis gigantea*, competidor natural de *Heterobasidion annosum*, causador de podridão-de-raiz e caule em coníferas - e Actinovat[®] - à base da cepa bacteriana *Streptomyces lydicus* WYEC 108 que tem espectro de ação contra fungos causadores de *damping-off* e podridão radicular. Esses dois produtos não são comercializados no Brasil, o que reforça a importância de testar a ação dos produtos disponibilizados no país, a fim de incentivar os produtores a investirem nessa alternativa, com o intuito de caminhar em direção à sustentabilidade na produção de mudas florestais.

Além da importância de testar e validar metodologias para os produtos comerciais já existentes, é relevante a possibilidade de obter rizobactérias e/ou gêneros fúngicos a partir da rizosfera e segmentos radiculares de mudas de *Pinus* cultivadas em viveiro. Essas bactérias e fungos, além de atuar na promoção do crescimento são potenciais no controle de fitopatógenos e se desenvolvem com naturalidade em associação com o sistema radicular das plantas. Algumas pesquisas apontam resultados promissores para eucalipto (TEIXEIRA, 2001; MAFIA et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2005) e para *Pinus* (CHANWAY et al., 2000; BRUNETTA et al., 2010).

Para comprovar que microrganismos com potencial de biocontrole podem ser isolados das sementes ou da rizosfera de mudas em viveiros e que os produtos que estão no mercado, registrados para outras culturas, são eficientes em espécies florestais, é importante que sejam realizados testes em condições de laboratório e de campo. Os estudos devem iniciar com testes *in vitro*, que demandam menos tempo e espaço. Nesse sentido, alguns autores relataram a eficiência de agentes biocontroladores à base de *Trichoderma* spp. sobre o fungo *Fusarium* spp. (CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2011; RU e DI, 2012) e de cepas da bactéria *Bacillus* spp. sobre o mesmo patógeno (CHEN et al., 2010; NIHORIMBERE et al., 2010; DUNLAP et al., 2011).

As avaliações *in vivo*, realizadas após os testes *in vitro*, são fundamentais para que o biocontrolador demonstre sua ação em condições de viveiro. A maioria dos trabalhos já realizados, além de apresentar resultados no controle da doença, apontaram ganhos na qualidade final de mudas, como é o caso de Wang et al. (2013), que relataram a eficiência de *Bacillus amyloliquefaciens* combinado com fertilizante orgânico, no controle da fusariose em banana; Moradi et al. (2012), que verificaram o controle de *F. oxysporum* com *Bacillus*

subtilis e *Trichoderma harzianum*; Morsy et al. (2009), que constataram a ação de *Trichoderma viride* e *Bacillus subtilis* no controle de *Fusarium solani*.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou: a) avaliar a qualidade fisiológica e sanitária de lotes de sementes de *Pinus* spp. oriundas de diferentes procedências; b) avaliar o potencial patogênico dos fungos associados aos lotes de sementes; c) identificar morfológicamente e molecularmente os isolados fúngicos com potencial patogênico; e d) testar a eficiência de agentes biocontroladores no tratamento das sementes.

Artigo1 - Maciel, C. G.; Muniz, M. F. B.; Mezzomo, R.; Reiniger, L. R. S. *Lasiodiplodia theobromae* associated with seeds of *Pinus* spp. originated from the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. *Scientia Forestalis*, v. 47, n. 107, 2015.

Abstract

Lasiodiplodia theobromae is a fungus commonly found associated with seeds, with the potential to be transmitted to seedlings. Generally, conifers become vulnerable to attack by the pathogen when exposed to stress conditions. This study aims to assess the sanitary and physiological quality of *Pinus* spp. seed lots; to verify pathogenicity of *Lasiodiplodia* sp. obtained from the transmission and sanitary tests, and then to identify these isolates at the species level. The sanitary test was performed through a "blotter test" and the pathogenicity test by contact of the seeds with the fungal culture for 48 hours. *Lasiodiplodia theobromae* was identified based on morphological characteristics and sequencing of the ITS region and proved to be pathogenic to *P. taeda* and *P. elliottii*, causing seed rot and damping-off.

Index terms: patogenicity, morphology, ITS

***Lasiodiplodia theobromae* associada a sementes de *Pinus* spp. oriundas do noroeste do Rio Grande do Sul, Brazil**

Resumo

Lasiodiplodia theobromae é um fungo comumente encontrado associado a sementes, com potencial para ser transmitido para as plântulas, as coníferas de uma maneira geral, quando expostas a condições de estresse tornam-se vulneráveis ao ataque deste patógeno. O presente trabalho teve como objetivos avaliar a qualidade

sanitária e fisiológica de lotes de sementes de *Pinus* spp.; verificar a patogenicidade de isolados de *Lasiodiplodia* sp. obtidos a partir do teste de sanidade e transmissão e, então, identificar esses isolados em nível de espécie. O teste de sanidade foi realizado pelo método do “blotter test” e o teste de patogenicidade através do contato das sementes e a cultura fúngica, por 48 horas. *Lasiodiplodia* sp. foi identificado com base em características morfológicas e no sequenciamento da região ITS, mostrou-se patogênico a *P. elliotii* e *P. taeda*, causando *damping-off* de pré e pós-emergência.

Palavras-chave: patogenicidade. morfologia. ITS.

Introduction

The percentage of forest seeds contaminated by saprophytic or pathogenic fungi grows constantly. According to Machado (2000), once installed in the seed, they are considered the most active pathogens with greater ability to directly penetrate and colonize the plant tissue.

Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon and Maubl. (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) is a fungus considered to be cosmopolitan, polyphagous and opportunistic (Punithalingam, 1980). This pathogen is commonly transmitted via seeds, with conifers being very susceptible to attacks (Cilliers et al. 1993). Association of *Botryodiplodia* with *Pinus* spp. is introduced by Ress (1988) and Shayesta and Rahman (1985). The pathogen causes different symptoms in annual and perennial species, such as death, gummosis and stem rot in *Mangifera indica* (Shahbaz et al. 2009); dry rot in *Malpighiae marginata* (Lima et al. 2012); dry rot of leaves and basal rot in post harvest of *Cocus nucifera*; dieback *Persea americana*,

Annona muricata L., *Spondia stuberosa* Arruda, death of the peduncle in *Carica papaya* (Lima et al., 2013).

Effective control of this pathogen becomes difficult because of characteristics of the fungus, such as be cosmopolitan and polyphagous and the wide variety of susceptible hosts. Kristensen et al. (2005), argue that verification of pathogenicity, geographical location of the affected plant, morphological and biological characterization of the isolate are all careful and fundamental steps for identifying needs in terms of species, which have the goal of supplementing the molecular phylogeny.

Given the above, this study had the following objectives: to survey the sanitary quality of *Pinus* sp. seeds; to evaluate the pathogenicity of *Lasiodiplodia* sp. in *Pinus* sp. seeds; and to identify isolates of *Lasiodiplodia* spp. at the species level, using morphological and molecular tools.

Materials and methods

The seeds of *Pinus elliottii* and *Pinus taeda* (Lot 2013) used in the study had their origin in the municipality of Ijuí (28°23'16"S e 53°54'53"O), located at the northwest region of Rio Grande do Sul state, Brazil. Four lots were used: two of *P. elliottii* (Lot1 and Lot2) and two of *P. taeda* (Lot3 and Lot4). The seeds used in the tests remained stored in a freezer (3-5 °C) for two weeks until their use as a method for breaking dormancy (Brasil, 2009).

Blotter test: performed with four replicates of 200 seeds, incubated at 25 ± 2 °C and 12 hour photoperiod; the assessment was conducted after seven days of incubation, with the aid of a stereoscopic microscope and optical. *Transmission test*: performed with four replicates of 200 seeds, incubated at 25 ± 2 °C and 12 hour

photoperiod; sand was used as a substrate, autoclaved at 120 ° C and 1 atm, for two periods of 60 minutes with an interval of 24 hours; weekly evaluations were performed with observation of symptoms. When structures of the pathogen were visualized in emerging and non-germinated seeds, in a blotter test or a transmission test, isolation and purification of the colony were performed for morphological and molecular characterization. Purification of the colony was carried out from the technical monosporic culture (Fernandes, 1993).

Table 1 - Isolates, origin, date and accession number of isolates of *L. theobromae*. Santa Maria, 2013.

Isolate	Origin	Date of collection	Accession number in GenBank
Bot1UFSM	Seeds of <i>P. taeda</i> (Lot4)	04/2013	KF924398
Bot2UFSM	Seeds of <i>P. taeda</i> (Lot3)	04/2013	KF924398

For morphological characterization, the transfer of the isolates proceeded from the pure colony to a culture medium of potato-dextrose-agar (PDA), plus sterilized pine needles (*Pinus* sp.) (Lima et al., 2013). They remained incubated for 25 days at a temperature of 25 ± 2 °C and 12 hours photoperiod, for scaling and photography of reproductive structures. Thirty conidia were evaluated by *Lasiodiplodia* sp. isolates, from which length and width measurements were considered.

To determine the average mycelial growth of isolates, we proceeded to transfer mycelium disks and the culture medium (12 mm) derived from pure cultures of the isolates to the center of a Petri dish containing PDA medium. The plates were incubated at 25 ± 2 °C with 12 hours photoperiod. The mycelial growth was observed

by measuring the diameter of the colony every 24 hours with the aid of a digital caliper. Two measures were executed in diametrically opposed directions. Then, the average growth for each plate (cm / day) was determined. After 15 days the color of the colony was determined using the Rayner color chart (1970).

For molecular characterization, fungal mycelium and spores of the pathogen were collected from cultures grown on PDA for two weeks at 20 °C in the dark. DNA extraction of the pathogen occurred with the CTAB method (cetyltrimethylammoniumbromide) (Dellaporta et al., 1983). Samples of extracted genomic DNA were subjected to Polymerase Chain Reaction (PCR) for the amplification of regions: ITS rDNA with primer pairs ITS1 and ITS4 (White et al., 1990). Each PCR reaction contained approximately 1 µL of DNA, 10 L of 5X GoTaq Reaction Buffer (Promega, EUA), 1 µL of mix of dNTPs, 1 µL of each primer, 0.2 µL GoTaq DNA polymerase (Promega, EUA) and water MiliQ autoclaved to complete the final reaction volume of 50 µL. The reactions were performed in a thermal cycler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, EUA) under the following thermal conditions: 94 °C for 2 min, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 2 min and elongation at 72 °C for 1 min. A final extension was performed at 72 °C for 4 min. At the end of the reaction, the PCR products were kept cold at a temperature of 4 °C. A negative control without DNA was included in the PCR amplifications. The amplified fragments and the control were visualized by electrophoresis on a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (1 mg L⁻¹) in 1X TAE buffer (Tris-acetate 0.04 M + 1 mM EDTA), and visualized under ultraviolet light. The marker 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA) was used as molecular weight marker. The PCR products obtained were purified following the protocol described by Schmitz e Riesner (2006) using polyethylene glycol 6000 (PEG 6000).

To compare sequences, sequences of *Lasiodiplodia theobromae* and *Botryosphaeria rhodina* (teleomorph) were used, all available in GenBank. The sequences from GenBank that showed the highest "scores" were selected and aligned with sequences obtained by sequencing the ClustalW algorithm. Furthermore, phylogenetic analysis was conducted adopting the "Neighbour-joining" method with 1000 replicates in the MEGA program version 4 (Tamura et al., 2007). The similarity of nucleotide sequences between isolates was calculated using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

For pathogenicity, initially, the seeds were sterilized with a solution of 70% alcohol (v / v) for 30 seconds, and then with a solution of sodium hypochlorite (1% v / v) for 1 minute. Afterwards, they were washed with sterile distilled water, and the seeds were then dried on sterile filter paper. Each treatment used 100 seeds, divided into four replicates of 25.

After the incubation period of the fungus (seven days at a temperature of 25 ± 2 °C with a photoperiod of 12 hours), inoculation was carried out by the method of contact of the seeds with the culture of the fungus for 48 hours, at a temperature of 25 ± 2 °C and 12 hours photoperiod. The control consisted of exposure of the seeds only to the PDA medium culture under the same conditions. After inoculation procedures, the test of emergence in sand was held, in which the seeds were placed in plastic boxes (11 x 11 x 3,5 cm) with sifted sand as substrate, sterilized in autoclave for two hours (with interval of 24 hours) 1 atm and 120 °C. The material remained incubated in a temperature-controlled room with a temperature of 25 ± 2 °C and with manual irrigation where necessary.

The variables evaluated were: a) speed of emergence index (SEI): daily count of emerged seedlings, considered when the hypocotyls were bigger than 1.0 cm. To

calculate the speed of emergence index (SEI), the equation suggested by Popinigis (1977) was used; b) seedling emergence: counting the number of seedlings at 28 days; c) abnormal seedlings symptomatic: seedling with symptoms caused by the fungus *Lasiodiplodia theobromae* were checked; d) non-germinated seeds: count of the seeds with rotted aspect and of those that had not started the germination process. For all variables, except the SEI, the results were expressed as percentages. The test was monitored for forty days. When the presence of damping-off was detected, the seedlings were collected and incubated in a moist chamber or placed in Petri dishes with PDA culture medium, with the goal of determining whether the damage was caused by the inoculated fungus, and then re-isolation was performed.

The Bot1UFSM and Bot2UFSM isolates were inoculated in four lots of *Pinus* sp. seeds. Means comparison was done by Tukey test at 5% probability; the software used was SISVAR 5.3 (Ferreira, 2008).

Results and discussion

The identified fungal genera associated with the different batches of seeds were: *Lasiodiplodia*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Aspergillus* (Table 2). The pathogen *Lasiodiplodia* spp. showed a higher incidence, especially in lots of *P. taeda* (Lot4 and Lot3), and therefore was used for pathogenicity tests.

Table 2 - Health characteristics of seed lots of *Pinus* sp. used in the study. Santa Maria, 2013.

Origin	Fungal genera (%)				
	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>

<i>P. taeda</i> - Lot4	33 a*	2,0 b	4,0 b	1,0 a	6,0 a
<i>P. taeda</i> - Lot3	43 a	13 a	12 b	2,0 a	1,0 a
<i>P. elliotii</i> – Lot1	9,0 a	0,0 b	83 a	0,0 a	0,0 a
<i>P. elliotii</i> – Lot2	15 a	3,0 b	7,0 b	0,0 a	0,0 a

* Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey test at 5% significance.

The *Lasiodiplodia* sp. isolates studied showed culture coloration gray/lead; conidial measurements ranged from 24.4 x 12.25 μm (length / width ratio 1.97) to 23.97 x 12.86 μm (length / width ratio 1.92) for Bot1UFMS and Bot2UFMS, respectively (Table 3). The conidia were characterized by an ellipsoid oval form, with thin walls, ranging between 0 and 1 septum (Figure 1C). According to Lima et al. (2013) the length / width ratio expresses the shape of the conidia, where the higher the value of this variable, the more tapered (ellipsoid) is the structure, and the lower this value, the more rounded (oval) is the conidia. These authors found a variation of conidia measures between 18.10 to 30.94 μm x 10.64 to 15.86 μm and length / width ratio of 1.52 to 2.26 for isolates of *Lasiodiplodia theobromae* obtained from tropical fruit. Alves et al. (2008) found (19)21-31(32.5) x (12)13-15.5(18.5) μm as measures of conidia of the *L. theobromae*. Only the anamorphic phase was observed.

The average growth rates in the middle of the PDA culture (25 ± 2 °C) were 39 and 36.5 mm.d^{-1} for isolates Bot1UFMS and Bot2UFMS, respectively. Gure et al. (2005) found values of 17 mm.d^{-1} for *Botryosphaeria parva* (malt extract agar (MEA) culture medium and 25 °C). Lima et al. (2013) observed a variation between 30 and 65.4 mm.d^{-1} for different isolates of *L. theobromae* associated with tropical fruit, under the same conditions as this study. Halfed-Vieira et al. (2007) found 36.2 mm.d^{-1}

¹ of medium mycelial growth of *L. theobromae*, isolated from *Citrus* sp., *Coccoloba nucifera*, *Acacia mangium*; Abdollahzadeh et al. (2010) found a mean increase of 40 mm.d⁻¹ for isolates of *L. theobromae* obtained from *Mangifera indica*, *Eucalyptus* sp., *Citrus* sp., *Salvadora persica*, *Juglans* sp., and *Terminalia catapa*, amid MEA culture.

Table 3 - Morphological characteristics of isolates *Lasiodiplodia* sp. obtained from seeds of *Pinus* sp. Santa Maria, 2013.

	Bot1UFSM	Bot2UFSM
Color of colony ¹	gray/lead	gray/lead
Measure of conidia ²	(20)24,4 (32,5)x(10) 12,25 (15)µm	(20)23,97 (30)x(10)12,86 (20)µm
Sporulation	+	++
Presence of picnidia ^{1,2}	+	++

¹ Potato dextrose agar culture medium, 25 ± 2 °C and a photoperiod of 12 hours; ² Acicula of pine-agar culture medium, 25 ± 2 °C and a photoperiod of 12 hours; (+): until five picnidia on each Petri dish; (++): more than ten picnidia on each Petri dish.

The pycnidium of black color could be viewed both on the surface of pine needles and internally in the culture medium (Figure 1B). The growth of pycnidium varied among isolates. The Bot1UFSM isolate presented lower development of these structures in the culture medium and hence lower sporulation. On the other hand, the Bot2UFSM isolate showed higher pycnidium development and sporulation. This difference did not affect the pathogenicity test, since both isolates are pathogenic for *Pinus* sp. seed (Table 4).

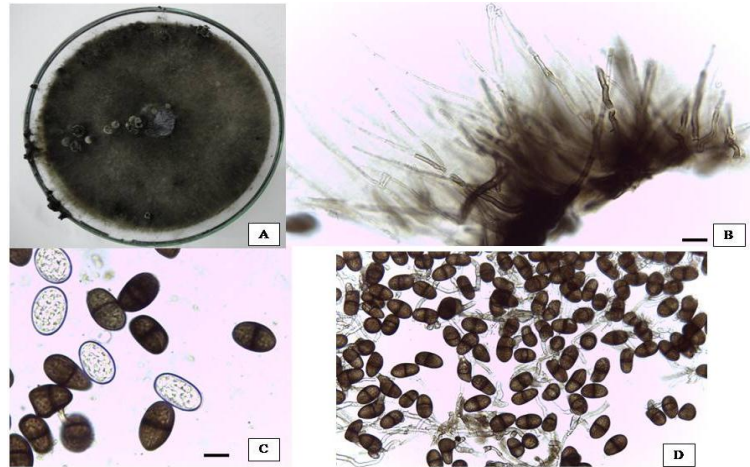


Figure 1 - Morphological characterization of *Lasiodiplodia theobromae*. PDA (A); paraphyses (B); immature hyaline conidia and mature conidia (C); mature conidia, dark-walled, one-septate (D). Scale bars = 10 μ m.

From the analysis of the ITS region of DNA from Bot1UFSM and Bot2UFSM isolates, it was concluded that both belong to the same species, *Lasiodiplodia theobromae* (anamorph *Botryosphaeria rhodina*) with a 99 bootstrap (Figure 2). Other authors have also based on ITS region to identify the *Botryosphaeraceae* family (Pavlic et al., 2004; Smith and Stanosz, 2001). Abdollahzadeh et al. (2010) agree that it is possible to distinguish *Lasiodiplodia* phylogeny species based on DNA, but in conjunction with a morphological analysis of the culture.

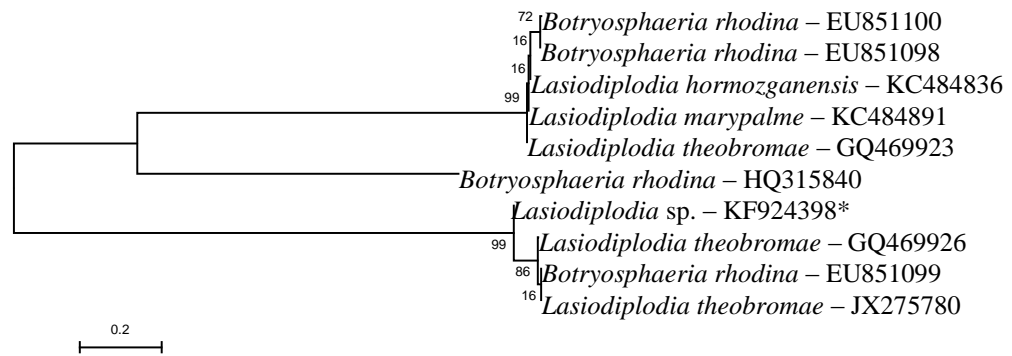


Figure 2 - Phylogenetic dendrogram based on the neighbor-joining method from the DNA sequences of the ITS region. The numbers on the branches indicate the percentage of bootstrap replications of the analysis in which the repeats were observed (1000 replications).

Was observed that the isolate Bot1UFSM is pathogenic to *Pinus taeda* (Lot4) and *P. elliotii* (Lot1) seeds, since it is statistically different from the control for the variables seedling emergence and normal seedlings (Table 4). In the case of Bot2UFSM isolate, the pathogenicity was observed for seeds of *P. taeda* (Lot4), *P. taeda* (Lot3) and *P. elliotii* (Lot4), considering the seedling emergence variable. When the percentage of normal seedlings was observed, this isolate also differed from the control for the lot of *P. elliotii* (Lot2). Symptoms observed in the pathogenicity test were hypocotyl rot, malformation of root and shoot and seedling damping-off (Figure 3A and 3B); in more advanced stages it was possible to observe the development of the reproductive structures of the pathogen on the seedling, both in the caulicle and the shoot (Figure 3C).

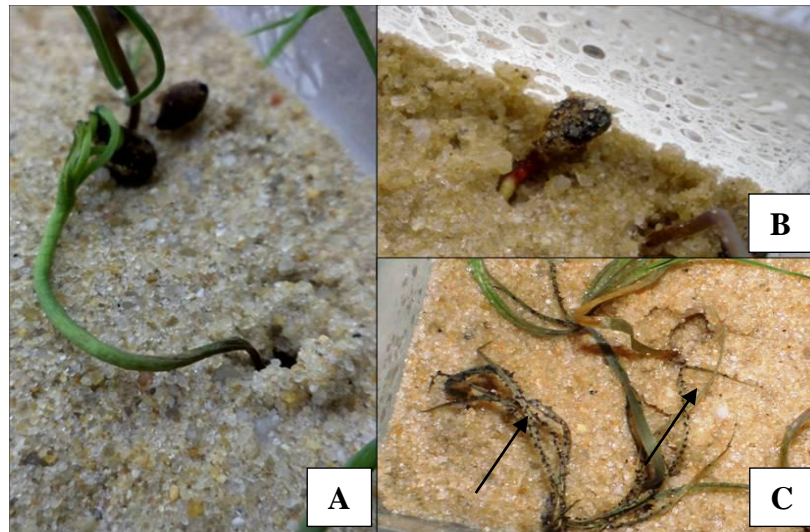


Figure 3 - Pathogenicity test of *Lasiodiplodia theobromae* in *Pinus* sp. seeds. Damping-off in *P. elliotii* (A); damping-off pre-emergence in *P. elliotii* (B) and reproductive structures of the pathogen in seedlings of *P. taeda* (C).

Reports of transmission of the pathogen *L. theobromae* via seed for different species of conifers has been described in the scientific environment. Among them, Cilliers et al. (1993) presents a literature review that includes associations of this fungus with seeds of *P. elliotii* and *P. taeda* (Carneiro, 1986); *P. caribea*, *P. resinosa* and *P. thumberghii* (Watanabe, 1988); *P. caribea* in Nicaragua (Ress, 1988) and *P. elliotii* U.S. (Fraedrich et al., 1994). These studies state that the pathogen is commonly found in the internal structures of the seed, causing a reduction in germination potential and seedling death.

Owolade et al. (2001) found elevated incidences of *Botryodiplodia theobromae* causing "blackned" in seeds of *Zea mays* (maize). Cardoso et al. (2006) reported the occurrence of this pathogen in seeds of *Annona muricata* L. (soursop), causing a reduction in germination potential.

Table 4 - Mean values of speed of emergence index (SEI), emergency (E), normal seedlings (NS), abnormal seedlings (AS) and non-germinated seeds (NGS) of *Pinus* sp. after inoculation with *Lasiodiplodia* sp. Santa Maria, 2013.

Lot x Isolated	Variables				
	SEI	E	NS	AS	NGS
<i>P. elliottii</i> Lot1 X Bot1UFMSM	9,05 b*	49,0 b	41,0 b	7,0 b	52,0 a
<i>P. elliottii</i> Lot1 X Bot2UFMSM	6,64 b	39,0 b	34,0 b	5,0 ab	61,0 a
<i>P. elliottii</i> Lot1	16,3 a	78,0 a	76,0 a	2,0 a	22,0 b
C.V. (%)	8,94	9,97	12,06	26,61	12,98

Lot x Isolated	Variables				
	SEI	E	NS	AS	SNG
<i>P. elliottii</i> Lot2 X Bot1UFMSM	10,7 ab	66,0 a	62,0 ab	4,0 a	34,0 a
<i>P. elliottii</i> Lot2 X Bot2UFMSM	9,3 b	57,0 a	48,0 b	8,0 a	44,0 a
<i>P. elliottii</i> Lot2	15,3 a	75,0 a	72,0 a	3,0 a	25,0 a
C.V. (%)	11,36	9,49	9,36	33,99	17,61

Lot x Isolated	Variables				
	SEI	E	NS	AS	NGS
<i>P. taeda</i> Lot4 X Bot1UFMSM	3,9 b	41,0 b	38,0 b	3,0 a	59,0 b
<i>P. taeda</i> Lot4 X Bot2UFMSM	2,8 b	25,0 c	25,0 c	1,0 a	74,0 a
<i>P. taeda</i> Lot4	13,8 a	73,0 a	72,0 a	1,0 a	27,0 c
C.V. (%)	9,11	6,23	5,85	54,55	5,04

Lot x Isolated	Variables				
	SEI	E	NS	AS	NGS
<i>P. taeda</i> Lot3 X Bot1UFMSM	7,0 a	48,0 ab	45,0 b	6,0 a	49,0 a
<i>P. taeda</i> Lot3 X Bot2UFMSM	5,37 a	47,0 b	38,0 b	11,0 a	51,0 a
<i>P. taeda</i> Lot3	9,65 a	64,0 a	60,0 a	4,0 a	36,0 a
C.V. (%)	14,86	7,83	10,92	38,77	9,65

*Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey test at 5% significance. Where: Bot1UFMSM and Bot2UFMSM are isolates of *Lasiodiplodia theobromae* obtained from seeds of *Pinus taeda* Lot4 and *Pinus taeda* Lot3, respectively, and CV: coefficient of variation.

This studied relate the first occurrence of *Lasiodiplodia theobromae* in seeds of *Pinus* sp. in Rio Grande do Sul state.

Conclusion

- The isolates were identified as *Lasiodiplodia theobromae*, according to morphological characteristics and analysis of the ITS region of DNA.
- *Lasiodiplodia theobromae* is pathogenic to the seeds of *P. elliottii* and *P. taeda* causing damping-off of pre and pos-emergence.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Foundation (Brazil).

References

- ABDOLLAHZADEH, J.; JAVADI, A.; GOLTAPPEH, E. M.; ZARE, R.; PHILLIPS, A. J. L. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. **Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 25, p. 1-10, 2010.
- ALVES A.; CROUS P. W.; CORREIA, A. PHILLIPS, A. J. L. Morphological and molecular data reveal cryptic species in *Lasiodiplodia theobromae*. **Fungal Diversity**, v. 28, p. 1-13, 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.
- CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, dos A. A.; MORAIS, M. H. Detecção e controle de *Lasiodiplodia theobromae* em sementes de graviola (*Annona muricata* L.). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 22 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 27).

- CARNEIRO, J. S. Mycoflora associated with seeds of forest trees. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 557-566, 1986.
- CILLIERS A. J.; SWART W. J.; WINGFIELD M. J. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. **South African Forestry Journal**, n. 166, p. 47-52, 1993.
- DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: version II. **Plant Molecular Biology Reporter**1, p. 19-21, 1983.
- FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, n. 2, p. 36-41, 2008.
- FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA. CNPT, 1993. 128 p.
- FRAEDRICH, S. W.; MILLER, T.; ZARNOCH, S. J. Factors affecting the incidence of black seed rot in slash pine. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 24, n. 8, p. 1717-1725, 1994.
- GURE A.; SLIPPERS, B.; STENLID, J. Seed-borne *Botryosphaeria* spp. from native *Prunus* and *Podocarpus* trees in Ethiopia, with a description of the anamorph *Diplodia rosulata* sp. nov. **Micological Research**, v. 109, n. 9, p. 1005-1014, 2005.
- HALFELD-VIEIRA, B. de A.; NECHET, K. de L.; SOUZA, G.R. de. Influência de meios de cultura e regimes de luz na esporulação e crescimento micelial de *Lasiodiplodia theobromae*. Boa Vista: Embrapa Roraima, 14p. 2007. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 2).
- KRISTENSEN, R., TORP, M.; KOSIAK, B.; HOLST-JENSEN, A. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological Research**, v. 109, n. 2, p. 173-186, 2005.

- LIMA, J. S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 2, p. 81-88, 2013.
- LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E.; MOREIRA, R. C.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 1, p. 9-16, 2012.
- MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. LAPS: UFLA: FAEPE, Lavras, MG. 2000. 138 p.
- OWOLADE, B. F.; FAWOLE, B.; OSIKANLU, Y. O. K. Fungi associated with maize seed discolouration and abnormalities in south western Nigeria. **African Crop Science Journal**, v. 9, n. 4, p. 693-697, 2001.
- PAVLIC, D.; SLIPPERS, B.; COUTINHO, T. A.; GRYZENHOUT, M.; WINGFIELD, M. J. *Lasiodiplodia gonubiensi* ssp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygiumcordatum* in South Africa. **Studies in Mycology**, n. 50, p. 313-322, 2004.
- POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: AGIPLAN, 1977. 289p.
- PUNITHALINGAM, E. **Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae***. Vaduz: Pat. J. Cramer, 1980. 123p.
- RAYNER, R. W. **A Mycological Colour Chart**. British Mycological Society and CAB International Mycological Institute, Kew. 1970.
- RESS, A. A. Infection of *Pinus caribaea* seed by *Lasiodiplodia theobromae*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 90, n. 2, p. 321-324, 1988.

- SHAHBAZ, M., Z.; IQBAL, A.; SALLEM, M. A. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). **Pakistan Journal Botany**, n. 41, v. 1, p. 359-368, 2009.
- SHAYESTA, B.; RAHMAN, M.A. Needle cast of *Pinus elliottii* at Forest Research Institute campus, Chittagong. **Bano Biggyan Patrika**, v.14, n.1/2, p.36-41, 1985.
- SLIPPERS B.; WINGFIELD, M.J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 90-106, 2007.
- SMITH, D. R.; STANOSZ, G. R. Molecular and morphological differentiation of *Botryosphaeria dothidea* (anamorph *Fusicoccum aesculi*) from some other fungi with *Fusicoccum* anamorphs. **Mycologia**, n. 93, p. 505-515, 2001.
- SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v.354, p.311–313, 2006.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 596-1599, 2007.
- WATANABE, T. Pathogenic fungi associated with forest tree seeds including *Pythium* species from cherry seeds (Abstr.). **Review of Plant Pathology**, n. 70, p. 557, 1988.
- WHITE, T. J.; BIRNS, T., LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. **Academic Press**, p. 315-322, New York, 1990.

Artigo 2 - Morphological and molecular identification of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides* associated with damping-off in *Pinus* spp.

Abstract

The occurrence of *Fusarium* spp. is one of the most limiting problems in nurseries, this pathogen can be transmitted via seed and cause damage in pre and post-emergence. This study aimed to identify the *Fusarium*'s species and to verify the pathogenicity of these isolates in *Pinus* sp. Were used two of *Fusarium*'s isolates and four lots of *Pinus* sp. seeds. Morphological characterization was performed based on key specific to *Fusarium* spp. identification and for molecular identification were sequenced the region ITS and the elongation factor 1- α (*tef1*). The pathogenicity test was conducted through the contact of the seeds with fungal culture for 48 hours, followed by sowing in sand. The variables evaluated were: SEI, emergency, non-germinated seeds, symptomatic seedlings and seedling damping-off. The F1UFMSM isolate was identified as *Fusarium verticillioides* and the F2UFMSM isolate as *F. oxysporum*. Both were pathogenic the seeds of *Pinus* sp., causing a reduction in the percentage of emergence and seedling damping-off.

Key words: Seeds: Elongation factor (*tef1*): *Pinus taeda*: *Pinus elliottii*

Identificação morfológica e molecular de *Fusarium oxysporum* e *Fusarium verticillioides* causando damping-off em *Pinus* spp.

Resumo

A ocorrência de *Fusarium* spp. é um dos problemas mais limitantes em viveiros, esse patógeno pode ser transmitido via semente e causar danos em pré e pós-emergência. O presente trabalho objetivou identificar isolados de *Fusarium* spp. em nível de espécie e verificar a patogenicidade desses isolados em *Pinus* sp. Foram utilizados dois isolados do patógeno e cinco lotes de sementes de *Pinus* spp. Para caracterização molecular, sequenciaram-se as regiões genômicas: ITS e fator de alongação 1- α (*tef1*), para morfologia dos isolados utilizaram-se chaves de identificação específica para o gênero *Fusarium*. O teste de patogenicidade foi realizado através do contato das sementes com a cultura fúngica por

48 h, seguida de semeadura em areia. As variáveis avaliadas foram: IVE, emergência, sementes não germinadas, plântulas sintomáticas e tombamento de plântulas. O isolado F1UFMSM foi identificado como *Fusarium verticillioides* e o F2UFMSM como *F. oxysporum*. Ambos foram patogênicos a *Pinus taeda* e *P. elliottii*, causando redução no percentual de emergência e tombamento de plântulas.

Palavras chave: Sementes: fator de alongação (*tef1*): *Pinus taeda*: *Pinus elliottii*:

Introduction

The occurrence of *Fusarium* spp. is one of the most limiting problems in nurseries, since the pathogen is native inhabitants of soil and cosmopolitan behavior, presenting difficult to control. Several species of *Fusarium* are associated with seed rot and damping-off seedlings of *Pinus* spp. such as *Fusarium sambucinum* in *Pinus elliottii* (Maciel et al., 2013); *F. circinatum* in *Pinus radiata* and *Pinus pinaster* (Landeras et al., 2005.); *Pinus maximinoi*, *Pinus patula necrose* and *Pinus tecunumanii* (Steenkamp et al., 2012.); damping-off and root rot in *Pinus taeda* and *P. elliottii* (Lori and Salerno, 2003). Pfenning et al. (2014) identified *F. circinatum* associated with *Pinus* in Brazil, this pathogen is considered a quarantine fungus.

Fusarium oxysporum and *Fusarium verticillioides* were pathogenic to seedlings of *Pinus nigra* in northwestern Spain, causing damping-off in pre-emergence and reduction in germination potential (Martín-Pinto et al., 2008). Due to the diversity of hosts that are compromised by *Fusarium* sp., it is necessary to identify the pathogen at the species level, to facilitate the applicability of the control strategies.

Along this line, O'Donnell et al. (2000); Leslie and Summerell (2006) point to three concepts of species that are involved to identify *Fusarium*: morphological, based on the similarity of the characters observed, called morphological markers; biological based on sexual compatibility between members of the same species; and the phylogenetic species concept, which is characterized based on the analysis of gene sequences. DNA analysis is a tool that facilitates the characterization,

identification and rapid diagnosis of pathogens (Weising et al., 1995), which has been complementing the morphological characterization, giving more credibility to the process of identifying the species.

Given the above, the objective of this study was to identify based on morphological and molecular characteristics, *Fusarium* spp. at the species level, and verify the pathogenicity of these isolates to *Pinus elliottii* and *Pinus taeda*.

Material and methods

Sampling and fungal isolation

The seeds of *Pinus elliottii* and *Pinus taeda* (Lot 2013) used in the study had their origin in the municipality of Ijuí (28°23'16"S e 53°54'53"O), located at the northwest region of Rio Grande do Sul state, Brazil. Five lots were used: two of *P. elliottii* (Lot1 and Lot2) and two of *P. taeda* (Lot3 and Lot4); and a fifth lot of seeds of *P. elliottii* (SP1) come from São Paulo, São Paulo state, Brazil. For isolation of the pathogen from the lots, seeds were subjected to the test by the "blotter test" method, which were incubated for seven days at 25 °C and 12 hours of photoperiod. After this period, the morphological characteristics of putative colonies of *Fusarium* on seed were observed. These were then subcultures into Petri dishes with a culture medium Potato-Dextrose-Agar (PDA) supplemented with 0.5 g.L⁻¹ streptomycin sulphate and incubated under the same conditions mentioned above. The characteristics of the resulting colonies were compared with the description of the genus *Fusarium* (Gerlach and Nirenberg 1982; Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell 2006). Two monosporic cultures were obtained (Table I) according to the methodology of Fenandes (1993) and stored in the mycological collection of Laboratory of Plant Pathology, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

Table I. Details of isolates *Fusarium* spp. utilized in the study.

Isolated	Origin	Collection period (month/year)	Access code in GenBank	
			ITS	TEF1
F1UFSM	Seeds of <i>P. elliotii</i>	04/2013	*	*
F2UFSM	Seeds of <i>P. taeda</i>	04/2013	*	*

* Sequences deposited in GenBank awaiting release of the access code.

Molecular characterization

For molecular characterization of the isolated fungal, mycelium and spores were collected from cultures grown on PDA medium for two weeks at 25 °C and 12 hours photoperiod. DNA extraction of the pathogen occurred as CTAB method (cetyltrimethylammonium bromide) (Dellaporta et al., 1983). The extracted genomic DNA samples were submitted to Polymerase Chain Reaction (PCR) for amplification of the rDNA ITS region using the pair of primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG 5'-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990) and the region of elongation factor 1 alpha, the pair of primers EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) and EF1-1567R (ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (Rehner and Buckley, 2005). Each PCR reaction contained approximately 1 µL of DNA, 10 µL of 5X GoTaq Reaction Buffer (Promega, EUA), 1 µL of mix of dNTPs, 1 µL of each primer, 0.2 µL GoTaq DNA polymerase (Promega, EUA) and water MiliQ autoclaved to complete the final reaction volume of 50 µL. The reactions were performed in a thermocycler GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer, EUA) under the following thermal conditions: 94 °C for 2 min, 40 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 2 min and elongation at 72 °C for 1 min. A final extension was performed at 72 °C for 4 min. At the end of the reaction, the PCR products were kept cold at a temperature of 4 °C. A negative control without DNA was included in the PCR amplifications. The amplified fragments and the control were visualized by electrophoresis on a 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (1 mg L⁻¹) in 1X TAE buffer (Tris-acetate 0.04 M + 1 mM EDTA), and visualized under ultraviolet light. The marker 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, USA) was used as molecular weight

marker. The PCR products obtained were purified following the protocol described by Schmitz and Riesner (2006) using polyethylene glycol 6000 (PEG 6000).

To compare sequences, sequences of *Fusarium* spp. and *Gibberella* spp. (teleomorph) were used, all available in GenBank. The sequences from GenBank that showed the highest "scores" were selected and aligned with sequences obtained by sequencing the ClustalW algorithm. Furthermore, phylogenetic analysis was conducted adopting the "Neighbor-joining" method with 1000 replicates in the MEGA program version 4 (Tamura et al., 2007). The similarity of nucleotide sequences between isolates was calculated using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Morphological characterization

For morphological characterization, the transfer of the isolates proceeded from the pure colony to a culture medium agar (2%), plus fragments (~3-5 mm²) of leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) sterilized (Nelson et al., 1983; Ventura, 1999). They remained incubated for 25 days at a temperature of 25 ± 2 °C and 12 hours photoperiod, for scaling and photography of reproductive structures. Thirty conidia were evaluated by isolates of *Fusarium* sp., from which length and width measurements were considered. To determine the staining of culture, aliquot mycelia was transferred to test tubes containing PDA medium and incubated for 10 days at 25 °C and under a light alternating with 12 hours photoperiod. The color was determined visually (front plate) with the aid of the literature (Nelson et al., 1983; Leslie and Summerell, 2006).

To determine the average mycelial growth of isolates, we proceeded to transfer mycelium disks and the culture medium (12 mm) derived from pure cultures of the isolates to the center of a Petri dish containing PDA medium. The plates were incubated at 25 ± 2 °C with 12 hours photoperiod. The mycelial growth was observed by measuring the diameter of the colony every 24 hours with the aid of a digital caliper. Two measures were executed in diametrically opposed directions. After end the measurement, the sporulation of each isolate was determined, was added 20 mL of sterile distilled water in each Petri dish and then these plates were scraped with the aid of the handle Drigalski, the suspension was filtered through gauze and the concentration of conidia was estimated (conidia.mL⁻¹) using Neubauer chamber. Five replicates for each isolate, each of which was represented by a Petri

dish of 90 mm diameter were used. For mycelial growth variable, the statistical analysis was performed using the regression against time in hours. The software used was SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010).

Pathogenicity test

The pathogenicity of isolates F1UFSM and F2UFSM in *Pinus* seeds was performed through the inoculation of pathogens in seeds of five lots in *Pinus elliottii* (Lot1, Lot2 and SP1) and *Pinus taeda* (Lot3 and Lot4). The seeds used in the tests remained stored in the freezer (-18 °C) for two weeks to its use as a method of breaking dormancy (Brasil, 2009). For pathogenicity, initially, the seeds were sterilized with a solution of 70% alcohol (v / v) for 30 s, and then with a solution of sodium hypochlorite (1% v / v) for 1 minute. Afterwards, they were washed with sterile distilled water, and the seeds were then dried on sterile filter paper. Each treatment used 100 seeds, divided into four replicates of 25.

After the incubation period of the fungus (seven days at a temperature of 25 ± 2 °C with a photoperiod of 12 h), inoculation was carried out by the method of contact of the seeds with the fungus culture of the fungus for 48 hours, at a temperature of 25 ± 2 °C and 12 h photoperiod. The control consisted of exposure of the seeds only to the medium culture PDA under the same conditions. After inoculation procedures, the test of emergence in sand was held, in which the seeds were placed in plastic boxes (11 x 11 x 3,5 cm) with sifted sand as substrate, sterilized in autoclave for two cycles of one hours (with interval of 24 hours) 1 atm and 120 °C. The material remained incubated in a temperature-controlled room with a temperature of 25 ± 2 °C and with manual irrigation where necessary.

The variables evaluated were: a) speed of emergence index (SEI): daily count of emerged seedlings, considered when the hypocotyls were bigger than 1.0 cm. To calculate the speed of emergence index (SEI), the equation suggested by Popinigis was used (1977); b) seedling emergence: counting the number of seedlings at 28 days; c) abnormal seedlings symptomatic: seedling with symptoms caused by the fungus *Fusarium* sp.were checked; d) non-germinated seeds: count of the seeds with rotted aspect and of those that had not started the germination process. For all variables,

except for the SEI, the results were expressed as percentages. When the presence of damping-off was detected, the seedlings were collected and incubated in a moist chamber or placed in Petri dishes with PDA culture medium, with the goal of determining whether the damage was caused by the inoculated fungus, and then re-isolation was performed.

Means comparison was done by Tukey test at 5% probability; the software used was SISVAR 5.3 (System Analysis of Variance for Balanced Data) (Ferreira, 2010).

Results and discussion

Pathogenicity test

Analyzing the values of SEI lots of study, with and without inoculation, notes that those who remained in contact with the pathogen before sowing had a lower rate of emergence speed. This means that the average number of seedlings per day decreased due to colonization of seed by the pathogen, thus causing an increase in the inequality of emergence of seeds, associated with reduced vigor. According to the data presented in Table II the isolates were pathogenic seeds of *Pinus* spp., directly interfering on seedling emergence variable, except for the seeds lot of *P. elliottii* (SP1), where no significant difference was for this variable. In this lot (*P. elliottii* - SP1) the difference was observed for the variables symptomatic seedlings and damping-off in post-emergence when compared with the control treatment. This result may indicate that the presence of the pathogen did not affect the initial formation processes (germination and emergence), but acted in a negative way during seedling development.

The fusariose, in seedling of different genera *Pinus*, is reported as an important disease in the nursery causing discoloration in needle, drying in apical part, browning of root growth and stagnation (Junior Grigoletti and Auer 2006); wilting and low seedling rate (Maciel et al., 2013.); rot and reduction in root development (Ocamb et al., 2002). In the present study where observed the symptoms: seed rot and damping in pre and post-emergence. These last checked two weeks after installation of the test (Figure 1).

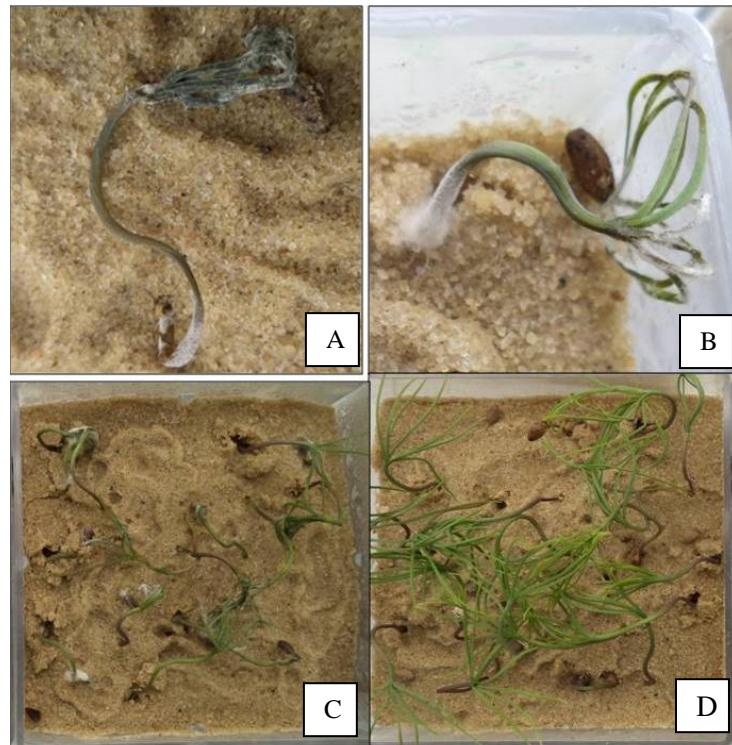


Figure 1 - Symptoms post-emergence observed in seedlings of *Pinus* sp. after the inoculation with *Fusarium* sp. (A, B and C); and control without inoculation (D).

The fungi that cause seed rot and damping-off, including *Fusarium*, are parasitic pathogens that establish relationship in the early stages of plant development, this way may interfere negatively in planting density, either in the field or nursery.

Sharfun-Nahar and Mushtaq (2006) reported transmission of *F. moniliformis* of sunflower seeds to seedlings, and pathogenicity test symptoms observed were rot, wilting and reduced growth. Chehri et al. (2011), identified 19 species of *Fusarium* associated with gibberella disease in wheat, the highest percentage of infected spikes by *F. graminearum* (75%), followed by *Fusarium culmorum* (65%), *Fusarium crookwellense* (50%), *Fusarium trichothecioides* (50%), *Fusarium chlamydosporum* (50%), *Fusarium avenaceum* (45%), *F. verticillioides* (45%) and *Fusarium sporotrichioides* (45%).

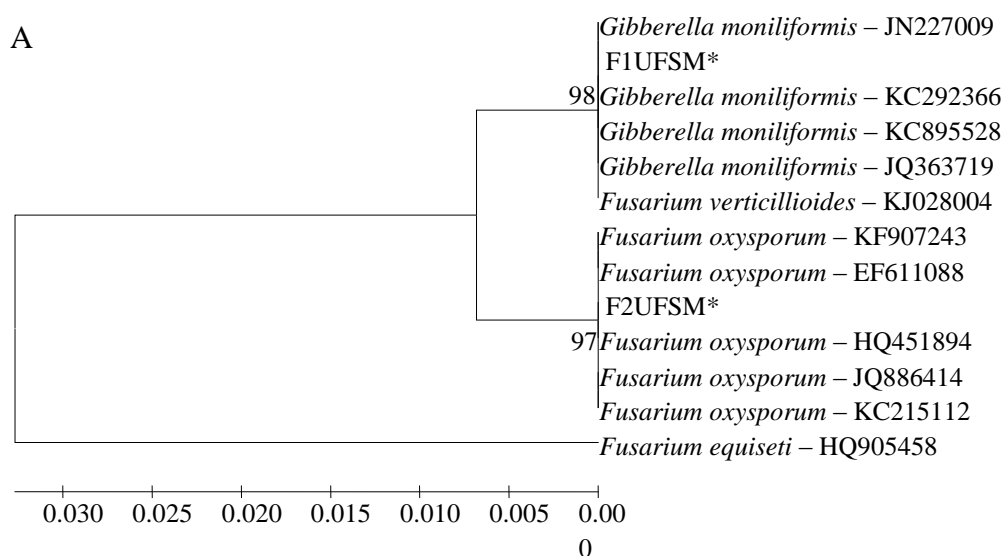
Table II - Mean values of speed of emergence index (SEI), emergency (E), non-germinated seeds (NGS) and symptomatic seedlings (SS) of *Pinus* sp. seeds after inoculation with *Fusarium* sp.

Lot x Isolates	Variables			
	SEI	E (%)	NGS (%)	SS (%)
<i>P. elliotii</i> Lot1 X F1UFSM	5,33 b*	38 b	62 b	50 a
<i>P. elliotii</i> Lot1 X F2UFSM	4,73 b	36 b	64 b	63 a
<i>P. elliotii</i> Lot1	16,3 a	78 a	22 a	11 b
Lot x Isolates	Variables			
	SEI	E (%)	NGS (%)	SS (%)
<i>P. elliotii</i> Lot2 X F1UFSM	9,3 b	50b	50 b	75 a
<i>P. elliotii</i> Lot2 X F2UFSM	5,4 b	39b	61 b	57 a
<i>P. elliotii</i> Lot2	15,3 a	75,0 a	25 a	26 b
Lot x Isolates	Variables			
	SEI	E (%)	NGS (%)	SS (%)
<i>P. taeda</i> Lot3 X F1UFSM	1,5 b	18 b	82 b	10 a
<i>P. taeda</i> Lot3 X F2UFSM	1,5 b	12 b	88 b	13 a
<i>P. taeda</i> Lot3	13,8 a	73,0 a	27 a	9,0 a
Lot x Isolates	Variables			
	SEI	E (%)	NGS (%)	SS (%)
<i>P. taeda</i> Lot4 X F1UFSM	2,05 b	17,0 b	83 b	34 a
<i>P. taeda</i> Lot4 X F2UFSM	3,02 b	19 b	81 b	39 a
<i>P. taeda</i> Lot4	9,65 a	64,0 a	36,0 a	21 a
Lot x Isolates	Variables			
	SEI	E (%)	NGS (%)	SS (%)
<i>P. elliotii</i> SP1 X F1UFSM	18,3 a	81 a	19 a	32 a
<i>P. elliotii</i> SP1 X F2UFSM	19,4 a	86 a	14 a	16 ab
<i>P. elliotii</i> SP1	13,6 a	81 a	19 a	0,0 b

*Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey test at 5% significance. Where: F1UFSM and F2UFSM are isolates of *Fusarium* sp. obtained from seeds of *P. elliotii* and *Pinus taeda*, respectively.

Molecular characterization

The DNA of the isolates *Fusarium* sp. was amplified with primers for sequencing reactions used. For the *tef1* region encoding were obtained fragments of approximately 677pb. Both regions analyzed were effective in the classification of the isolates studied in the same clade of other sequences of *Fusarium* spp. deposited in the GenBank with high bootstrap values. To construct the phylogenetic tree, based both on internal transcribed spacer region (ITS), and in the region of elongation factor 1 - α (*tef1*), GenBank accessions that showed the highest coverage ($\geq 95\%$) and similarity were chosen ($\geq 98\%$) (Figure 2). The isolated F1UFMSM was allocated in the same clade species *F. verticillioides* (anamorph *Gibberella moniliformis*) with a bootstrap of 98 and 87, while F2UFMSM was grouped with the species *F. oxysporum* with 97 and 84 bootstrap respectively for ITS and *tef1*. According Geiser et al. (2004), the gene encoding *tef1* has become the most common marker, since it is a highly informative between *Fusarium* single copy gene. Schoch et al. (2012) emphasize the importance of specific markers for *Fusarium*, such as elongation factor 1 - α , and, indicate the ITS region as a potential universal code for the identification of fungi. The ITS region was considered efficient for identification and separation of *Fusarium* (Menezes et al., 2010). Molecular markers, ITS and *tef1*, are considered practical tools, fast and at low cost, and efficient for discrimination and identification of *Fusarium* spp. (Arif et al., 2012).



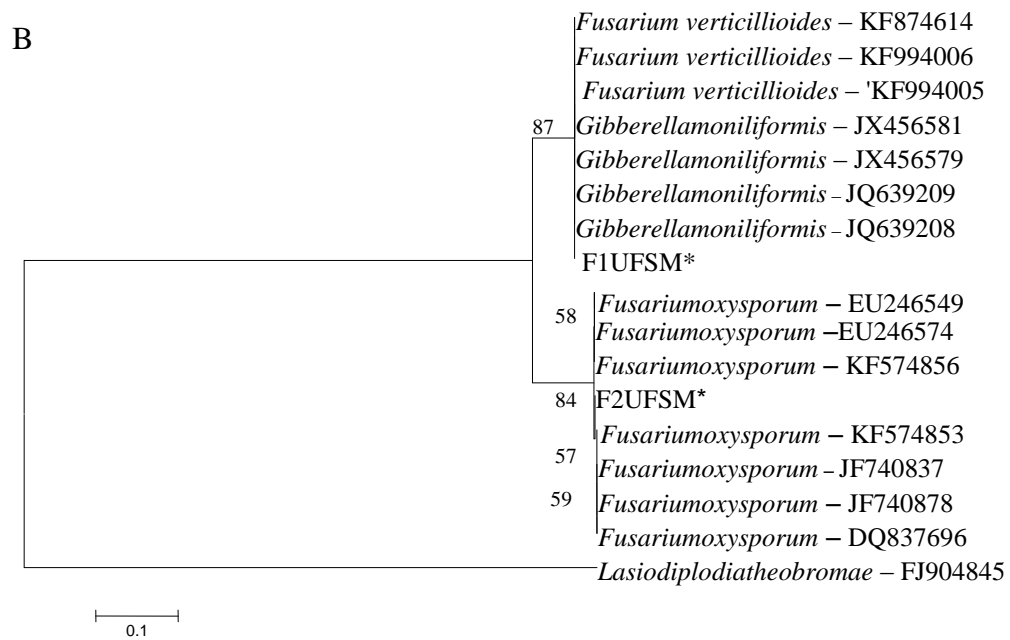


Figure 2 - Phylogenetic dendrogram based on neighbor-joining method from the DNA sequences of the ITS region (A) and 1 α - Elongation factor (B). The numbers on the branches indicate the percentage of repetitions of the bootstrap analysis in which the repeats were observed (1000 repetitions). * Isolates of *Fusarium* spp. obtained in this study.

Morphological characterization

According to macroscopic and microscopic characteristics of the isolated of colony F1UFMSM was allocated in Liseola section, while F2UFMSM was framed in section Elegans, these sections are divided according to the morphological similarity of species (Gerlach and Nirenberg, 1982; Nelson et al., 1983), and provide a direction for the sequence during the identification process. The isolates were identified as *Fusarium verticillioides* (synonym *F. moniliforme*) and *Fusarium oxysporum*, to F1UFMSM and F2UFMSM, respectively. However, the confirmation of species was possible from the molecular determination (Figure 2). According to Leslie and Summerell (2006), the combinations of phylogenetic and biological concepts have a high potential for consistent characterization of the genus *Fusarium*. Furthermore, the use of molecular techniques for DNA analysis has allowed the development of fast, sensitive and specific methods for the diagnosis of pathogens, for complementary to the morphological analysis (Teixeira et al., 2004).

The isolated F1UFSM presented in pigmentation tone light beige in PDA culture medium, while the isolate F2UFSM showed tone violet (Figure 4) and the medium mycelial growth of the isolates was 11.05 cm.dia⁻¹ (Figure 3). Gupta et al. (2010) reported that *Fusarium oxysporum* f. sp. *psidii* and *F. solani* showed maximum growth of 7.25 cm at a temperature of 28 °C, after seven days of incubation. Skovegaard et al. (2003) recorded an average daily increase of 5.1 cm for isolates of *F. commune*.

For variable sporulation in leave-carnation-agar (LCA), it was observed that the isolate F1UFSM showed higher sporulation compared with F2UFSM ranging from 11.25 x 10⁶ and 4.44 x 10⁶ conidia.mL⁻¹, respectively (Table III). Species of *F. verticillioides* produce sparse macroconidia while *F. oxysporum* has abundant production of these structures (Leslie and Summerell 2006). Silva and Teixeira (2012) found an average sporulation of 3.09 x 10³ conidia mL⁻¹ for *F. solani*, using 12-hour photoperiod and PDA medium. On the other hand, Lazarotto et al. (2014), in tests with medium of culture LCA to species of complex *Gibberella fujikuroi* found high levels of sporulation, reaching 12.68 x 10⁶ conidia mL⁻¹ for one of their isolates (F5). The LCA medium favors the ultimate expression of the characteristics and sporulation of the genus *Fusarium* (Nelson et al., 1983 and Ventura, 1999).

Table III - Morphological characteristics of the *Fusarium* spp. isolates obtained of seeds from *Pinus* sp.

	F1UFSM <i>Fusarium verticillioides</i>	F2UFSM <i>Fusarium oxysporum</i>
Color of colony ¹	Tone light beige	Tone violet
Measure of conidia ²	(27,5)36,9(42,5)x(1,25)2,7(3,75)µm	(10)14,67(17,5)x(2,5)2,7(5)µm
Shape macroconidia ²	Long and slender; slightly falcate	Apical cell morphology short, slightly hook; basal cell foot shaped
Sporulation ²	11,25 x 10 ⁶ conidia.mL ⁻¹	4,44 x 10 ⁶ conidia.mL ⁻¹
Presence of sporodochia ²	+	+
Presence of microconidia	+	+
Presence of clamydospores	-	+

¹ Potato dextrose agar culture medium, 25 ± 2 °C and a photoperiod of 12 hours; ² Leave-carnation-agar culture medium, 25 ± 2 °C and a photoperiod of 12 hours

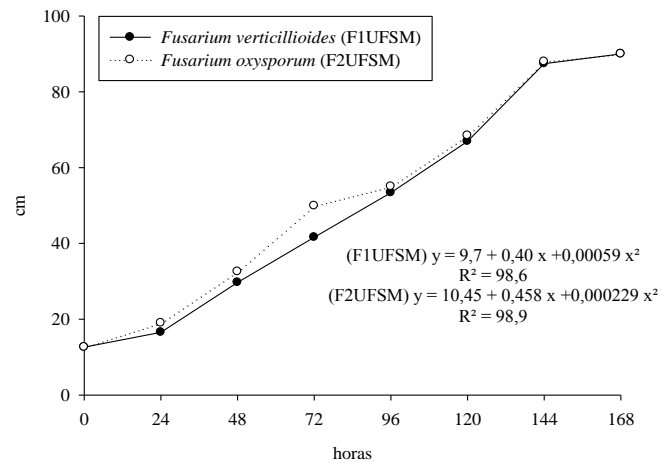


Figure 3 - Regression analysis to the colony diameter of *F. verticillioides* and *F. oxysporum* (F1UFSM and F2UFSM) on PDA medium incubated at 25 °C and photoperiod 12 hours.

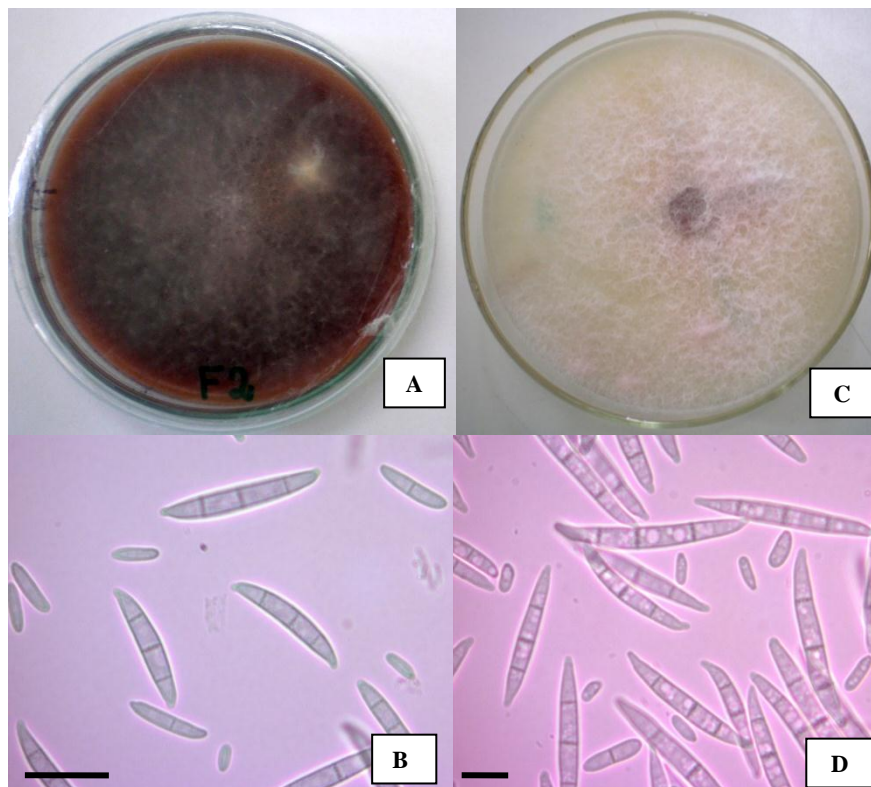


Figure 4 – Morphological characterization of *Fusarium* sp. A) *In vitro* culture on PDA of *Fusarium oxysporum* (F2UFSM); B) Macroconidia and microconidia of *F.oxysporum* (F2UFSM); C) *In vitro* culture on PDA of *Fusarium verticillioides* (F1UFSM); D) Macroconidia and microconidia of *F. verticillioides* (F1UFSM).

The present study contributed to the knowledge on the diversity and pathogenicity of *F. oxysporum* and *F. verticillioides* associated with *Pinus*'s seeds. Further analyses involving other *Fusarium*'s species associated with *Pinus*'s seeds would be beneficial to compare the difference between species and effects on *Pinus* seedlings.

Conclusion

The *Fusarium*'s species identified were *F. verticillioides* and *F. oxysporum* and are pathogenic to *P. taeda* and *P. elliottii*, causing damping-off in pre-and post-emergence.

Acknowledgment

This work was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior) Foundation (Brazil). The research is supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Project number 473722 / 2013 – 5.

References

Arif M, Chawla S, Zaidi NW, Rayar JK, Variar M, Sing US (2012) Development of specific primers for genus *Fusarium* and *F. solani* using rDNA sub-unit and transcription elongation factor (TEF-1 α) gene. *African Journal of Biotechnology*. 11: 444-447.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) *Regra para análise de sementes*. Brasília, DF.

Chehri K, Maghsoudlou E, Asemani M, Mirzaei MR (2011) Identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with head blight of wheat in Iran. *Pakistan Journal of Botany*.43: 2607-2611.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.

Fernandes MR (1993) *Manual para laboratório de fitopatologia* Passo Fundo: EMBRAPACNP; 128p.

Ferreira DF (2010) Sisvar versão 5.3 (Biud 75). *Sistemas de análises de variância para dados balanceados: Programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos*. Lavras, Universidade Federal de Lavras.

Geiser DM, Jiménez-Gasco M del M, Kang S, Makalowsk I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K (2004) FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*.*European Journal Plant Pathology*.110: 473-479.

Gerlach W, Nirenberg H (1982) *The genus Fusarium – a pictorial atlas* Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land – und. Forstwirtschaft.406 p.

Gupta VK, Misra AK, Gaur RK (2010) Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* L. in Índia. *Journal of Plant Protection Research*. 50: 451-462.

Grigoletti Junior A, Auer CG (2006) *Fusariose em mudas de Pinus taeda* Colombo: Embrapa Florestas, 3 p. (Comunicado técnico 166).

Landeras E, Garcia P, Fernandez Y, Braña M, Fernández-Alonso O, Méndez-Lodos S (2005) Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. *Plant Disease*. 89: 1015.

Lazarotto M, Mezzomo R, Maciel CG, Finger G, Muniz MFB (2014) Mycelia growth and sporulation of *Fusarium chlamydosporum* species complex under different culture conditions. *Revista de Ciências Agrárias*. 57: 35-40.

Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium laboratory manual*. (2006) 1 ed. Blackwell Publishing: USA. 2006, 388 p.

Lori GA, Salerno MI (2003) *Fusarium* species on seeds of *Pinus taeda* L. and *Pinus elliottii* Engelm. in Argentina. Centro de Investigaciones de Fitopatología. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 110: 437–443.

Pfenning LH, Costa SS, Melo MP, Costa H, Ventura JA, Auer CG, Santos ÁF (2014) First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. *Tropical Plant Pathology*.39: 210-216.

Maciel CG, Muniz MFB, Milanesi PM, Lazarotto M, Blume E, Harakawa R, Reiniger LRS, Hamann FA (2013) First report of *Fusarium sambucinum* associated on *Pinus elliottii* seeds in Brazil. *Plant Disease*. 97: 995.

Martín-Pinto P, Pajares J, Díez J (2008) Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* seedlings in northwest Spain. *Forest Pathology*.38: 78-82.

Menezes JP, Lupatine M, Antonioli ZI, Blume E., Junges E. Manzoni CG (2010) Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. *Ciência e Agrotecnologia*. 34: 132-139.

Nelson PE, Tousson TA, Marasas WFO (1983) *Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification*. Philadelphia: Pennsylvania State University Press. 193 p.

Ocamb CM, Juzwik J, Martin FB (2002) *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests*.24: 67–79.

O'Donnell K (2000) Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia*. 92: 919-938.

Popinigis F 1977 *Fisiologia da semente*. Brasília: AGIPLAN. 289p.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.109: 1-6.

Schmitz A, Riesner D (2006) Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*. 354: 311–313.

Sharfun-Nahar MM (2006) Pathogenicity and transmission studies of seed-borne *Fusarium* species sec. *Liseola* and *Sporotrichiella* in sunflower. *Pakistan Journal of Botany*. 38: 487-492.

Silva JL, Teixeira RNV (2012) Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. *Agro@ambiente On-line*.6: 47-52.

Steenkamp ET, Rodas CA, Kvas M, Wingfield MJ (2012) *Fusarium circinatum* and pitch canker of *Pinus* in Colombia. *Australasian Plant Pathology*. 41: 483–491.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 596-599.

Teixeira H, Vieira M, Machado JC (2004) Marcadores RAPD na análise da diversidade genética de isolados de *Acremonium strictum*. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 651-655.

Ventura JA (1999) Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos: Parte I - História, meios e procedimentos de cultivo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo. 7: 271-298.

Weising K, Nybom H, Pfenninger M, Wolff K, Meyer W (1995) *DNA fingerprinting in plants and fungi*. Boca Raton: CRC Press. 322 p.

Artigo 3 - CONTROLE BIOLÓGICO DE *LASIODIPLODIA THEOBROMAE* ASSOCIADA A SEMENTES DE *PINUS SP.*

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antagonista de seis produtos biológicos (Trichodermil[®], Trichodel[®], Quality[®], Rizos[®], Rizolyptus[®] e Nutrisolo[®]) e uma cepa bacteriana (*Bacillus sp.*-UFSM) no controle *in vitro* e *in vivo* de *Lasiodiplodia theobromae* patogênico a *Pinus spp.* Os testes *in vitro* foram realizados através da inibição do crescimento micelial, após incubação por sete dias a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Para os testes *in vivo*, as sementes, inicialmente, foram inoculadas com o patógeno e, na sequência, microbiolizadas com os agentes antagonistas, para posterior semeadura. A inoculação foi realizada através do método de contato em meio BDA por 48 horas. Todos os produtos testados apresentaram resultados positivos nos testes *in vitro*, destacando-se em relação à testemunha. Nutrisolo[®], Trichodel[®] e *Bacillus sp.*-UFSM apresentaram valores superiores à testemunha para diâmetro de colo em mudas de *P. elliottii*. Enquanto para *P. taeda*, *Bacillus sp.*-UFSM, Quality[®], Trichodel[®] e Trichodermil[®] alcançaram os maiores valores para essa variável. De maneira geral os agentes antagonísticos atuaram promovendo as variáveis de qualidade final de mudas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*.

Palavras-chave: *Trichoderma sp.*; *Bacillus sp.*; confronto direto; qualidade de mudas

Abstract

The study aimed evaluated antagonistic action of six biologic products (Trichodermil[®], Trichodel[®], Quality[®], Rizos[®], Rizolyptus[®] e Nutrisolo[®]) and a bacterial strain (*Bacillus sp.*-UFSM) on control *in vitro* and *in vivo* of *Lasiodiplodia theobromae*. The *in vitro* tests were performed by direct confrontation method, at 25 ± 2 °C and photoperiod of 12 hours. To *in vivo* tests (green house), the seeds were inoculated with pathogen and after microbiolized with antagonists' agents, and then sown. The inoculation was performed through contact of seeds with microorganisms in BDA medium, during 48 hours. Products tested showed positive results in *in vitro* tests, overcoming the control. Nutrisolo[®], Trichodel[®] and *Bacillus sp.*-UFSM presented high values for stem diameter in *P. elliottii* seedlings. To *P. taeda*, *Bacillus sp.*-UFSM, Quality[®], Trichodel[®] and Trichodermil[®] where highlighting. Generally, the antagonists' agents improved the variables of quality seedlings.

Keywords: *Trichoderma sp.*; *Bacillus sp.*; direct confrontation; seedlings quality

INTRODUÇÃO

Dentre as doenças associadas ao gênero *Pinus* no estágio inicial de desenvolvimento de plântulas, as causadas por fungos merecem destaque, devido à agressividade e pouca especificidade dos patógenos. *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon e Maubl. (syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat.) é um patógeno oportunista encontrado associado a sementes do gênero *Pinus*, causando redução no potencial germinativo e no desenvolvimento de plântulas, assim como podridão de sementes (MACIEL *et al.*, 2015; CILLIERS *et al.*, 1993). Segundo Sutherland, Diekmann; Berjak (2002), as sementes podem atuar como vetores de disseminação de fungos, a partir do momento em que lotes são transportados de uma região para outra, os patógenos permanecem associados ao órgão de reserva, tornando-se hábeis para disseminação.

A contaminação das sementes pode ocorrer durante o seu processo de coleta e armazenamento. As primeiras estratégias a serem adotadas para prevenção e controle de fungos associados a sementes são àquelas relacionadas às condições adequadas de coleta e armazenamento, seguidas do tratamento das sementes com fungicidas e agentes antagonistas. O uso de produtos biológicos apresenta-se como uma alternativa promissora, considerando a crescente necessidade de cuidados com o meio ambiente. Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos, o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural quanto realizar a introdução de um agente

biocontrolador (BETTIOL; MORANDI, 2009). A liberação do uso de biocontroladores dentro da agricultura orgânica em 2009 foi determinante para ampliar as pesquisas e consolidar processos de registros desses agentes no Brasil (BETTIOL, 2011).

Bactérias e fungos estão envolvidos em atividades de biocontrole, sendo que o gênero *Trichoderma* desempenha um papel importante no controle de doenças de plantas (SABA *et al.*, 2014). A promoção de crescimento de plantas pela aplicação de *Trichoderma* foi inicialmente relacionada ao controle dos microrganismos prejudiciais presentes no solo (MACHADO *et al.*, 2012). Entretanto, na ausência de fitopatógenos, segundo Lucon (2009), tal mecanismo de ação pode estar associado à produção de hormônios ou fatores de crescimento, à maior eficiência no uso e absorção de nutrientes, bem como, ao aumento da disponibilidade de nutrientes para planta. Testes com agentes biológicos como *Trichoderma* sp. e/ou *Bacillus* sp. vêm se mostrando eficientes no controle de diferentes fitopatógenos como é o caso de *Rhizoctonia* sp. em sementes de *Cedrela fissilis* (LAZAROTTO *et al.*, 2013); *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii* (SBRAVATTI JUNIOR *et al.*, 2014) e *Cylindrocladium candelabrum* em *Eucalyptus saligna* (MACIEL *et al.*, 2012).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antagonista *in vitro* e *in vivo* dos agentes antagônicos *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. no controle de *Lasiodiplodia theobromae*, patogênico às plântulas de *Pinus elliottii* e *Pinus taeda*, assim como sua ação na qualidade final das mudas produzidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de Fitopatologia e na casa de vegetação pertencentes ao Departamento de Defesa Fitossanitária, localizados na Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS – Brasil. Foram utilizados dois lotes de sementes, *Pinus elliottii* e *Pinus taeda*, oriundos do município de Ijuí (28°23'16"S e 53°54'53"O), região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.

Os isolados fúngicos foram obtidos a partir dos lotes de sementes utilizados nesse estudo, sua identificação morfológica, molecular e patogenicidade foi confirmada em trabalho anterior (MACIEL *et al.*, 2015). A cepa bacteriana de *Bacillus* sp. utilizada no trabalho também foi obtida a partir dos lotes de semente em estudo e armazenada no Laboratório de Fitopatologia – UFSM, até sua utilização.

Ao total foram utilizados dois isolados fúngicos patogênicos a *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* (Tabela 1) e sete agentes antagonistas (Tabela 2).

Tabela 1. Características de isolados patogênicos a *Pinus* sp. utilizados no presente estudo.

Table 1. Characteristics of isolates pathogens to *Pinus* sp. used in this study.

Isolado	Espécie	Origem	Acesso no GenBank
BOT1UFSM	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Sementes de <i>Pinus taeda</i>	KF924398
BOT2UFSM	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Sementes de <i>Pinus taeda</i>	KF924398

Tabela 2. Características dos produtos/isolado testados.

Table 2. Characteristics of products/isolates tested.

Espécie	Concentração (Céls viáveis.ml ⁻¹)	Formulação	Marca comercial	Empresa
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai	2 x 10 ⁹	suspensão	Trichodemil	Itaforte Bio Produtos

		concentrada	SC1306	
<i>Trichoderma asperellum</i>	1x10 ¹⁰	grânulos dispersíveis em água	Quality WG	Grupo Farroupilha
<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma viride/atroviride</i> , <i>Trichoderma viride</i> . Pers.	1x10 ⁹	suspensão concentrada	Trichodel	Empresa Caxiense de Controle Biológico Ltda
<i>Bacillus subtilis</i> Cohn	5x10 ⁹	suspensão concentrada	Rizos	Grupo Farroupilha
<i>Bacillus subtilis</i>	1x10 ⁸	suspensão concentrada	Rizolyptus	Grupo Biosoja
<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma asperellum</i> , <i>Trichoderma koningiopsis</i> Samuels	1x10 ¹¹	Suspensão concentrada	ICB Nutrisolo	ICB BIOAGRITEC
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	Obtido a partir de sementes de <i>P. taeda</i>	-

Ação dos biocontroladores *in vitro*

A ação antagonista de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* sp. sobre *Lasiodiplodia theobromae* foi avaliada através do teste de confronto direto, os produtos comerciais foram crescidos (7 dias à 25 °C) em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) antes de serem utilizados. Foram organizadas as duas seguintes combinações:

Trichoderma spp. x *Lasiodiplodia theobromae*: um disco de meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) de 8 mm de diâmetro contendo micélio de *L. theobromae* de sete dias, foi transferido para placas de Petri (90 mm de diâmetro) também contendo meio BDA, a aproximadamente 5 mm da borda da placa. Esse material foi incubado durante 48 h a 25±2 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA, com 8 mm de diâmetro, contendo micélio de *Trichoderma* spp. foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *L. theobromae* nas placas de Petri. As placas foram incubadas durante sete dias a 25±2 °C, com fotoperíodo de 12 h. As placas controle foram compostas apenas por *Trichoderma* spp. e *L. theobromae*. Foram realizadas medidas de crescimento do diâmetro da colônia do patógeno, diariamente, com o auxílio de um paquímetro digital.

Bacillus sp. x *Lasiodiplodia theobromae*: um disco de meio de cultura BDA de 8 mm de diâmetro, contendo micélio de *L. theobromae*, foi transferido para o centro da placa de Petri (90 mm de diâmetro), também contendo meio BDA. Esse material foi incubado durante 48 h a 25±2 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, quatro gotas de 10 µL de suspensão bacteriana (10⁸ ufc mL⁻¹) foram dispostas equidistantes entre si e do centro da placa de Petri, uma gota em cada quadrante. As placas foram mantidas em incubadora, nas mesmas condições. As avaliações foram baseadas em medidas diárias do crescimento do diâmetro da colônia do patógeno, com o auxílio de um paquímetro digital, e verificação da formação de halo de inibição, metodologia adaptada de Sottero *et al.* (2006).

A partir dos dados de crescimento micelial (mm), calcularam-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial, segundo Menten *et al.* (1976), com a fórmula: % inibição =

$[(\text{crtest} - \text{crtrat}) / \text{crtest}] \times 100$, em que crtest = crescimento radial da testemunha e crtrat = crescimento radial do tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com oito tratamentos e cinco repetições, em que cada repetição foi composta por uma placa de Petri. Inicialmente, foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o *software* BioEstat 5.0. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{x} + 0,5$, para a análise da variância. Os resultados em unidades decimais não sofreram transformações. A comparação das médias foi feita pelo teste LSD (Least Sgnificance Difference) a 5% de probabilidade utilizando-se o *software* SISVAR 5.3 (Ferreira, 2010).

Ação dos biocontroladores *in vivo*

Para a composição dos tratamentos do teste *in vivo*, foram utilizados cinco produtos/isolados com potencial antagonista em relação a testemunha (Tabela 3). As sementes utilizadas nos testes permaneceram armazenadas no freezer (3-5 °C) por duas semanas até a sua utilização, como método de superação da dormência (BRASIL, 2009). Antes da aplicação das técnicas, as sementes passaram por uma assepsia superficial. Utilizou-se uma solução de álcool 70% (v v⁻¹) por 30 seg, em seguida hipoclorito de sódio 1% (v v⁻¹) por 1 min e, na sequência, três banhos em água destilada e esterilizada e, então, foram deixadas secar sobre papel-filtro esterilizado. As sementes foram inoculadas com *Lasiodiplodia theobromae* (Bot2UFSM), esse isolado foi selecionado pelo desempenho nos testes *in vitro*. As sementes permaneceram em contato com a cultura fúngica por 48 horas (incubação a 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h), na sequência passaram pelo mesmo processo para inoculação do agente antagonico. Os tratamentos testemunhas receberam apenas a inoculação de *Lasiodiplodia theobromae*.

Após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram semeadas em bandejas (45 x 28 x 13 cm), divididas em quatro repetições de 25 sementes por tratamento, totalizando 100 sementes. O substrato utilizado foi Carolina Soil[®], com o intuito de aproximar as condições reais de produção de mudas em viveiros comerciais. O material foi mantido em casa de vegetação com temperatura entre 22 e 26 °C e com irrigação diária através de um sistema de microtubos Cada tratamento recebeu 400 mL de água por dia, sendo esta quantidade dividida em quatro irrigações de 50 mL.

As avaliações foram: a) emergência: semanais (até os 60 dias), computando-se o número de plântulas emergidas, resultados expressos em porcentagem. Na última contagem de emergência (60 dias), realizaram-se as seguintes avaliações: b) diâmetro do colo, comprimento da parte aérea, radicular e comprimento total: mediram-se 10 plântulas por repetição. Estas avaliações foram realizadas com o auxílio de paquímetro digital; c) massa verde de plântulas: todas as plântulas de cada repetição foram pesadas em balança analítica de precisão 0,01 g.; e d) massa seca de plântulas: para a determinação da massa seca, as plântulas utilizadas na determinação da massa verde foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60±3 °C até atingirem massa constante.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições para cada teste realizado. Inicialmente, verificou-se se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, no Programa BioEstat 5.0. Para a análise da variância, os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{x} + 0,5$. Os resultados em unidades decimais não sofreram transformações. A comparação das médias foi feita pelo teste de LSD (Least Sgnificance Difference) a 5% de probabilidade, com o *software* SISVAR 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A redução do crescimento micelial do patógeno quando confrontado com o antagonista, pode-se dar por vários fatores entre eles parasitismo, antibiose e competição. A produção de enzimas hidrolíticas extracelulares tais como, quitinases, β -1, 3-glucanases e proteases também está correlacionada com a ação antagonista, isso foi verificado por Mishra (2010), que encontrou resultados promissores em testes *in vitro* de cepas de *Trichoderma* sp. contra *Pythium aphanidermatum*.

No presente estudo, a utilização dos agentes antagônicos reduziu o crescimento micelial dos dois isolados do patógeno, diferindo estatisticamente da testemunha (Tabela 3). Para o isolado Bot1UFMSM o produto Nutrisolo[®] à base de *Trichoderma* sp. apresentou os resultados mais promissores (49,73 cm), seguido do Trichodel[®] (54,01 cm), *Bacillus* sp. UFMSM (57,55 cm) e Quality[®] (59,09 cm). Nos tratamentos em que o patógeno foi confrontado com as cepas bacterianas (Rizolyptus[®], Rizos[®] e *Bacillus* sp.-UFMSM), foi possível observar a formação de um halo de inibição (Figura 1D), interrompendo o crescimento do patógeno. Essa zona de inibição pode ser explicada pela produção de enzimas hidrolíticas extracelulares e também metabólitos voláteis e não voláteis pelo agente antagonista.

Testes *in vitro*, comparando a eficiência do *Trichoderma* e fungicidas no controle de *L. theobromae* foram realizados por Bhadra *et al.* (2014), onde os autores encontraram percentual de inibição entre 60-80% para as cepas utilizadas e consideram a utilização de *Trichoderma* promissora e com efeitos menos agressivos ao meio ambiente que os produtos químicos. De doze cepas de *Trichoderma* testadas *in vitro* para o controle de *L. theobromae*, patogênica à *Annona squamosa*, três apresentaram alta atividade de biocontrole (KUNZ, 2007), dessa maneira torna-se importante a realização de bioensaios *in vivo*, visto que algumas condições de temperatura e umidade podem interferir no desenvolvimento tanto do agente de biocontrole, quanto do patógeno.

SAJITHA; FLORENCE; DEV (2014) testaram o desempenho de dezessete cepas bacterianas no controle *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae*, patogênico a *Hevea brasiliensis*, destas, sete apresentaram potencial antagonista, sendo seis delas pertencentes ao gênero *Bacillus*. Resultados semelhantes foram apresentados por Zhang *et al.* (2014), que apostaram no controle biológico para diminuir a alta aplicação de fungicidas no controle de *Lasiodiplodia* sp. que causa danos na madeira de álamo, os autores ressaltaram a eficiência da cepa B37 - *Bacillus subtilis* no controle *in vitro* do patógeno.

Tabela 3. Crescimento micelial e porcentagem de inibição de *Lasiodiplodia theobromae* em cultivo pareado com *Trichoderma* spp. e *Bacillus* sp., *in vitro*, após cinco dias de incubação (25 ± 2 °C – fotoperíodo de 12 h).

Table 3. Growth mycelial and inhibition of percentage mycelial of *Lasiodiplodia theobromae* in paired culture with *Trichoderma* spp. and *Bacillus* sp., *in vitro*, five days after de incubation (25 ± 2 °C – photoperiod of 12 h).

Tratamento	Crescimento micelial (cm)		% de inibição	
	<i>L. theobromae</i> (Bot1UFMSM)	<i>L. theobromae</i> (Bot2UFMSM)	<i>L. theobromae</i> (Bot1UFMSM)	<i>L. theobromae</i> (Bot2UFMSM)
Trichodermil [®]	68,29 d*	54,69 abc	14,63 d	31,63 abc
Quality [®]	59,09 c	61,17 c	26,13 c	23,53 c
Trichodel [®]	54,01 b	42,25 a	32,48 b	43,43 a
Nutrisolo [®]	49,73 a	50,20 ab	37,83 a	37,24 ab
Rizolyptus [®]	73,4 e	73,5 d	8,15 e	8,12 d

Rizos [®]	71,15 de	71,5 d	11,31 de	10,31 d
<i>Bacillus</i> sp.-UFSM	56,55 bc	57,55 bc	28,00 bc	28,06 bc
Testemunha	80 f	80 d	0,0 f	0,0 d
C.V. (%)	4,36	11,16	17,78	37,39

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de LSD a 5% de significância. C.V: coeficiente de variação.

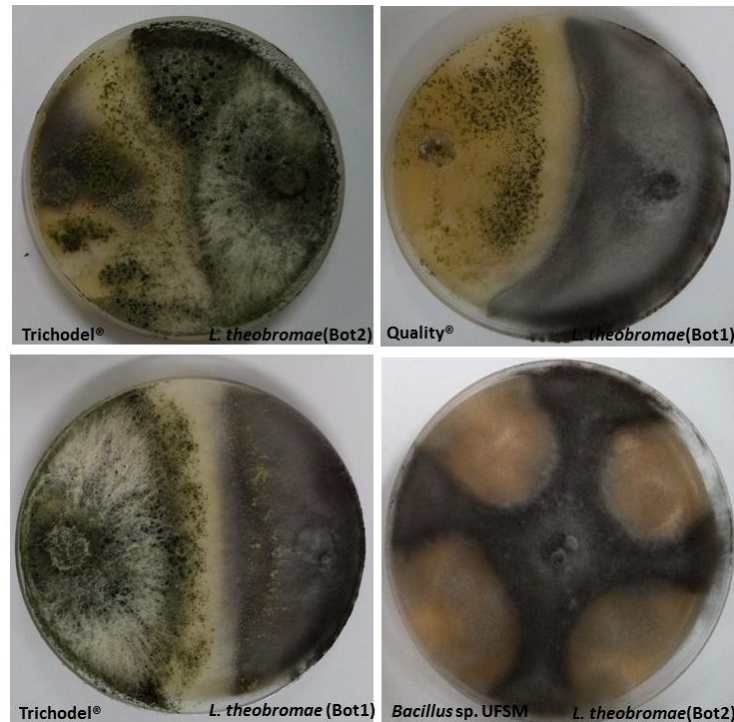


Figura 1. Confronto direto dos agentes antagonistas com o patógeno *Lasiodiplodia theobromae*.
Figure 1. Direct confrontation of antagonists with the pathogen *Lasiodiplodia theobromae*.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados referentes à qualidade final de mudas de *Pinus elliottii* produzidas aos 60 dias, após o tratamento das sementes com os agentes antagonísticos. O tratamento das sementes com Trichodermil[®] conferiu maiores valores numéricos para a variável emergência de plântulas, alcançando 77%, entretanto este diferiu apenas do tratamento com Nutrisolo[®] (48%). Para a variável diâmetro do colo, os tratamentos com Nutrisolo[®], Trichodel[®] e *Bacillus* sp.-UFSM apresentaram resultados promissores, diferindo estatisticamente da testemunha.

A necessidade de substituir e/ou reduzir a utilização de produtos químicos, faz com que outros estudos nessa mesma linha de pesquisa ampliem seu espaço. *L. theobromae* foi verificado causando podridão em *Manihot esculenta* Crantz na Tailândia, e estudos apontaram a utilização de controle biológico como uma alternativa promissora no controle do patógeno. Os autores testaram 15 isolados de *Trichoderma* spp., e comprovaram sua ação *in vitro* e *in vivo* (BUENSANTEAI; DUSIT ATHINUWAT, 2012).

Tabela 4. Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de *Pinus elliottii*, através das variáveis: emergência (E), diâmetro do colo (DC), comprimento de parte aérea (PA), comprimento de parte radicular (PR), massa verde total (MVT) e massa seca total (MST) aos 60 dias.

Table 4. Effect of biocontrol in the final quality of seedlings of *Pinus elliottii*, through the variables: emergency (E), stem diameter (SD), shoot length (SL), root length (RL), total fresh matter (TFM) and total dry matter (TDM) to sixty days.

Tratamentos	Variáveis					
	E (%)	DC (cm)	PA (cm)	PR (cm)	MVT (g)	MST (g)
Trichodel [®]	62 ab	1,3 ab	10,33 ^{ns}	14,64 ^{ns}	6,00 ^{ns}	2,47 ^{ns}
Trichodermil [®]	77 a	1,24 abc	9,84	13,57	6,81	2,60
Quality [®]	58 ab	1,18 bc	8,83	11,57	4,59	2,09
Nutrisolo [®]	48 b	1,33 a	9,81	12,93	4,94	2,20
<i>Bacillus</i> sp.-UFSM	71 ab	1,24 ab	10,43	15,44	7,63	2,85
Testemunha	68 ab	1,10 c	9,90	13,18	6,61	2,54
C.V (%)	30,39	7,6	16,1	29,5	39,1	22,3

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. ^{ns} Não significativo pelo teste LSD a 5% de significância. CV: coeficiente de variação.

O percentual de emergência para plântulas de *Pinus taeda* não diferiu aos 60 dias, variando entre 50–68% (Tabela 5). Para a variável diâmetro do colo, o tratamento das sementes com *Bacillus* sp.-UFSM apresentou o maior valor (1,09 cm), seguida do Quality[®] (1,00 cm), Trichodel[®] (0,98 cm) e Trichodermil[®] (0,97 cm). Para outras variáveis como comprimento de parte radicular, massa verde e massa seca observou-se resultados superiores numericamente com a utilização dos biocontroladores, porém não houve diferença significativa. Dessa maneira, percebe-se que a aplicação desses agentes antagonistas confere melhores condições ao substrato e desenvolvimento da muda, e testes com tempo de exposição superior a 60 dias podem ser realizados para que a diferença em relação a testemunha, que não recebeu os agentes, possa ser visualizada estatisticamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Machado *et al.*, (2015), tratando o substrato com *Trichoderma* sp., os autores não observaram diferença estatística para emergência de plântulas de *Gochnatia polymorpha*, entretanto, variáveis finais de desenvolvimento de plântula expressaram resultados superiores com os isolados 2B2 e 2B22 de *T. harzianum*.

Brunetta *et al.* (2010) avaliaram a ação *in vivo* de 99 isolados de rizobactérias promotoras de crescimento em mudas de *Pinus taeda*, destes, apenas seis (UFV-AL9, UFV-AM5, UFV-AM2, UFV-F3, UFV-G2 e UFV-G4) destacaram-se quanto à indução de crescimento e ao índice de qualidade de muda.

Tabela 5. Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de *Pinus taeda*, através das variáveis: emergência (E), diâmetro do colo (DC), comprimento de parte aérea (PA), comprimento de parte radicular (PR), massa verde total (MVT) e massa seca total (MST) aos 60 dias.

Table 5. Effect of biocontrol in the final quality of seedlings of *Pinus* sp., through the variables: emergency (E), stem diameter (SD), shoot length (SL), root length (RL), total fresh matter (TFM) and total dry matter (TDM) to sixty days.

Tratamentos	Variáveis					
	E (%)	DC (cm)	PA (cm)	PR (cm)	MVT (g)	MST (g)
Trichodel [®]	50 ^{ns}	0,98 abc	7,07 c	9,78 ^{ns}	3,10 ^{ns}	1,71 ^{ns}
Trichodermil [®]	68	0,97 abc	8,09 bc	11,26	4,21	2,04
Quality [®]	60	1,00 ab	9,23 a	11,67	3,74	1,97
Nutrisolo [®]	64	0,89 bc	7,62 bc	9,04	3,38	1,80
<i>Bacillus</i> sp.-UFSM	65	1,09 a	7,62 bc	12,09	3,47	1,82
Testemunha	62	0,86 c	8,52 ab	8,93	3,36	1,84
C.V (%)	34,75	8,96	10,18	29,71	26,54	13,74

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste LSD a 5% de significância. ^{ns} Não significativo pelo teste LSD a 5% de significância. C.V: coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

- Os agentes de controle biológico à base de *Trichoderma* spp. e *Bacillus* spp. mostraram-se eficientes no controle *in vitro* de *Lasiodiplodia theobromae*.

- Os agentes antagonísticos não interferiram na qualidade final de mudas de *Pinus taeda* e *Pinus elliottii*.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro através de bolsa de doutorado concedida; e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do projeto número 473722 / 2013 – 5.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHADRA, M.; KHAIR, A.; HOSSAIN, A.; SIKDER, M. Efficacy of *Trichoderma* spp. and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae*. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, Bangladesh, v. 49, n. 2, p. 125-130, 2014.

BETTIOL, W. Biopesticida use and research in Brazil. **Outlooks and Pest Management**, Essex, p. 280-283, 2011.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para análise de sementes**. Brasília, DF. 395p. 2009.

BRUNETTA, J. M. F. C.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; GOMES, J. M.; BINOTI, D. B.; FONSECA, N. A. N. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 399-406, 2010.

BUENSANTEAI, N.; ATHINUWAT, D. The antagonistic activity of *Trichoderma virens* strain TvSUT10 against cassava stem rot in Thailand. **African Journal of Biotechnology**, Bowie, v. 11, n. 84, p. 14996-15001, 2012.

CILLIERS A. J.; SWART W. J.; WINGFIELD M. J. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. **South African Forestry Journal**, Pretoria, n. 166, p. 47-52, 1993.

KUNZ, R. **Control of Post Harvest Disease (*Botryodiplodia* sp.) of Rambutan and *Annona* Species by Using a Bio-Control Agent (*Trichoderma* sp.)**. Experiments were undertaken by the Industrial Technology Institute (ITI) in cooperation with the International Centre for Underutilised Crops (ICUC). p. 1-44. Africa. 2007.

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

LUCON, C. M. M. **Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. Infobibos, Informações Tecnológicas.** Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm> 2009. (Acesso em 03.11.2015).

MACHADO, D. F. M.; TAVARES, A. P.; LOPES, S. J.; SILVA, A. C. F. da. *Trichoderma* spp. in emergence and growth of cambará seedlings (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 1, p. 167-176, 2015.

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

MACIEL, C. G.; LAZAROTTO, M.; MEZZOMO, R.; POLETTO, I.; MUNIZ, M. F. B.; LIPPERT, D. B. *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n. 5, p. 825-832, 2012.

MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; MEZZOMO, R.; REINIGER, L. R. S. *Lasiodiplodia theobromae* associated with seeds of *Pinus* spp. originated from the northwest of Rio Grande do Sul, Brazil. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 43, n. 107, 2015. <Disponível em: <http://www.ipef.br/publicacoes/scientia/leitura.asp?Article=15&Number=107&p=n>> Acesso em 02/11/2015.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MUNISSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 1, p. 57-66, 1976.

MISHRA, V. K. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. **Journal of Phytohygiene**, Noida, v. 2, n. 9, p. 28-35, 2010.

SABA, H. *Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol agente. **Mycosphere**, Guiyang, v. 3, n. 4, p. 524-531, 2014.

SAJITHA, K. L.; FLORENCE, E. J. M.; DEV, S. A. Screening of bacterial biocontrols against sapstain fungus (*Lasiodiplodia theobromae* Pat.) of rubberwood (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.). **Research in Microbiology**, Paris, v. 165, p. 541-548, 2014.

SBRAVATTI JÚNIOR, J. A.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C.; SANTOS, A. F. dos; SCHULTZ, B. Seleção *in vitro* de fungos endofíticos para o controle biológico de *Botrytis cinerea* em *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, Curitiba, v. 43, n. 1, p. 145-152, 2013.

SOTTERO A. N.; FREITAS, S. dos S.; MELO, A. M. T. de; TRANI P. E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 225-234, 2006.

SUTHERLAND, J. R.; DIEKMANN, M.; BERJAK, P. **Forest Tree Seed Health**. IPGRI Technical Bulletin No. 6. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 2002.

ZHANG, X.; ZHAO, G.; LI, D.; LI, S.; HONG, Q. Identification and Evaluation of Strain B37 of *Bacillus subtilis* Antagonistic to Sapstain Fungi on Poplar Wood. **The Scientific World Journal**, New York, v. 2014, p. 1-10, 2014.

DISCUSSÃO

A caracterização dos lotes utilizados no estudo está apresentada nas Tabelas 1, 2 e 3 (Apêndice A). Os lotes apresentaram valores uniformes para as variáveis de qualidade fisiológica (Tabela 2 – Apêndice A). Quanto à caracterização sanitária, cinco gêneros fúngicos foram identificados através do *blotter test*, sendo eles: *Lasiodiplodia*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Aspergillus* (Tabela 3 – Apêndice A). Destes, *Lasiodiplodia* sp. e *Fusarium* sp. apresentaram potencial patogênico durante o teste de transmissão.

O *blotter test* é um dos métodos mais comuns para a identificação de patógenos associados a sementes, esse método é relativamente simples e barato, entretanto quando verifica-se a necessidade de identificação precisa, os métodos moleculares tornam-se efetivos. No presente estudo utilizou-se a reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção da presença ou ausência do gênero *Fusarium* associado aos lotes de sementes em estudo, uma vez que durante o *blotter test* a incidência deste patógeno apresentou valores $\leq 2\%$ (Tabela 3– Apêndice A), entretanto no teste de transmissão verificou-se vários sintomas associados a presença desse patógeno nas plântulas de *Pinus* sp. A detecção, para cada lote, foi realizada utilizando primers específicos para o gênero *Fusarium* e a metodologia de extração do DNA seguiu a utilizada no Artigo II. A presença de *Fusarium* sp. foi detectada em todos os lotes, com exceção de *Pinus elliottii* – Lot2 (Tabela 4 – Apêndice A). Métodos moleculares foram utilizados com sucesso para a detecção de *Fusarium* sp. em sementes de *Pinus* sp. (DREADEN et al. 2012; IOOS et al. 2009; SCHWEIGKOFER et al. 2004) e ainda, a utilização de primers específicos pode permitir a identificação precisa em nível de espécie.

O teste de transmissão tem como objetivo acompanhar a evolução do patógeno associado à semente durante o desenvolvimento da plântula, e dessa maneira apontar aqueles fungos com potencial patogênico sobre o hospedeiro. Durante este teste, visualizaram-se sintomas de tombamento em pré e pós-emergência, além do apodrecimento da semente e os fungos associados a esses sintomas foram *Lasiodiplodia* sp. e *Fusarium* sp. (Figura 1).

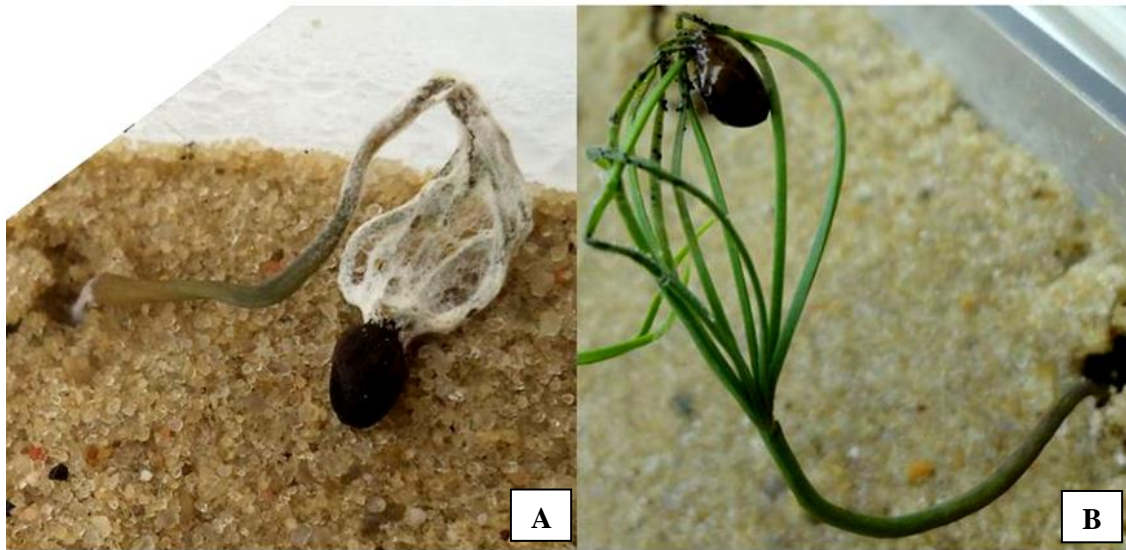


Figura 1 – Sintomas observados no teste de transmissão. (A) Associação de *Fusarium* sp. com *Pinus elliottii*; e (B) associação de *Lasiodiplodia* sp. com *Pinus taeda*. Fonte: a autora

Quatro isolados fúngicos foram obtidos a partir dos lotes em estudo, oriundos de plântulas e sementes de *Pinus* sp. (Tabela 5 – Apêndice A). Inicialmente, realizou-se o teste de patogenicidade com *Lasiodiplodia* sp. e verificou-se que os isolados foram patogênicos quando inoculados às sementes (Artigo 1 – Tabela 5), reduzindo o potencial germinativo em até 65 % para *Pinus taeda* Lot4. No caso da inoculação dos isolados de *Fusarium* sp. nas sementes de *Pinus* sp. também foi possível constatar a patogenicidade, através da redução do índice de velocidade de emergência, potencial germinativo e presença de plântulas sintomáticas (Artigo 2 – Tabela II).

Os sintomas visualizados após a inoculação dos isolados de *Fusarium* sp. e *Lasiodiplodia* sp. nas sementes de *Pinus* sp. foram muito semelhantes, basicamente podridão de sementes e tombamento de plântulas em pré e pós-emergência. Esses sintomas são característicos de patógenos veiculados pela semente e se enquadram nos Grupos I (podridão de órgãos de reserva) e II (*damping – off*), propostos por Mc New em 1970 (AMORIM et al., 2011). Os patógenos desses grupos caracterizam-se por baixa especificidade e alta agressividade, sendo assim são pouco evoluídos parasiticamente, precisando causar a morte das células do hospedeiro para a manutenção da sua sobrevivência. A observação dos sintomas no teste de patogenicidade foi mais rápida quando as sementes foram inoculadas com *Lasiodiplodia theobromae*, esse fungo apresenta um potencial de crescimento mais agressivo em meio de cultivo, conseguindo colonizar uma placa de Petri com meio BDA em apenas quatro dias, enquanto *Fusarium* sp. necessita de, no mínimo, sete dias. Essas

informações sobre os patógenos direcionam os estudos para estratégias de controle que atuem na proteção da semente, previamente à entrada e multiplicação do inóculo inicial.

A caracterização morfológica e molecular de *Fusarium* sp. mostrou-se mais complexa quando comparada com *Lasiodiplodia* sp.. O primeiro gênero apresenta características morfológicas muito próximas entre espécies diferentes, como é o caso do complexo *Gibberella fujikuroi*. Dentro desses grupos há uma variação mínima entre as características morfológicas das espécies, que se encontra em avaliação (LESLIE e SUMERELL, 2006), tornando indispensável a identificação molecular, em muitos casos baseada em mais de uma região genômica. Para as espécies de *Fusarium* sp. fez-se uso das regiões ITS e fator de alongação (EF - 1 α), obtendo-se um elevado valor de *bootstrap* (Artigo 2 – Figura 2). Por outro lado, para o gênero *Lasiodiplodia* o sequenciamento da região ITS associado com caracteres morfológicos foi suficiente para determinação da espécie (Artigo 1 – Figura 2).

O uso de *Trichoderma* sp. e *Bacillus* sp. em testes *in vitro* apresentou resultados promissores para o controle de *Lasiodiplodia theobromae* e *Fusarium* sp.. Os mecanismos de ação dos antagonistas foram eficientes na batalha contra os patógenos (Artigo 3 – Tabela 3 e Figura 1), com exceção do teste de metabólitos voláteis para *Lasiodiplodia theobromae*. Nesse último caso, a velocidade de crescimento do patógeno em meio de cultura se equivale à do antagonista, e por isso, não foi possível estabelecer uma posição de controle. Já para os testes realizados em casa de vegetação, não foram verificadas diferenças discrepantes entre as sementes com e sem inoculação, algumas variáveis que caracterizam qualidade final de mudas apresentaram diferença estatística, como é o caso do diâmetro de colo. Entretanto, a maioria delas apresentou valores superiores quando recebeu o tratamento, mas não o suficiente para diferenciar da testemunha. O uso de agentes biocontroladores pode potencializar a qualidade final das mudas, especialmente quando manipulado a longo prazo no sistema de produção.

A necessidade de conhecer e entender a dinâmica da associação de patógenos com as sementes de espécies florestais torna-se cada vez mais importante. O aumento na produção de mudas para abastecer o setor florestal e a pressão para reduzir os custos nos sistemas de produção encontra-se com a possibilidade de utilizar medidas de controle protetivas nas sementes, como a microbiolização com agentes antagonistas. Esses agentes trazem possibilidades de atuar no controle de patógenos, e ainda na promoção do crescimento e no estabelecimento das mudas no viveiro. O uso do controle biológico associado com práticas culturais adequadas, potencializa a produtividade e reduz custos com manejo curativo, na maioria dos casos associado à aplicação de fungicidas. Dessa maneira, a identificação precisa dos agentes patogênicos e o estabelecimento de medidas de controle que atuem na redução inicial do inóculo e na potencialização das condições de resistência do hospedeiro, direcionam para um sistema de manejo ambientalmente correto e economicamente viável.

CONCLUSÕES

- O percentual de germinação dos lotes de sementes de *Pinus* spp. foi superior a 70%.
- Foram identificados os gêneros fúngicos *Fusarium*, *Lasiodiplodia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* associados as sementes de *Pinus* spp.
- *Fusarium verticillioides*; *F. oxysporum* e *Lasiodiplodia theobromae* foram patogênicos a *Pinus* spp., causando *damping-off* em pré e pós-emergência.
- Os agentes de biocontrole foram eficientes frente a *Fusarium verticillioides*; *F. oxysporum* e *Lasiodiplodia theobromae in vitro*; e não interferiram no desenvolvimento das mudas quando confrontados *in vivo*, com *L. theobromae*.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A.M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia** – v. 1. Editora: Agronômica Ceres. 704p. 2011.
- AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A. F. dos. **Doenças em Pinus: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 28 p. (Circular técnica 48).
- BETTIOL, W. et al. **Produtos Comerciais à Base de Agentes de Biocontrole de Doenças de Plantas**. Jaguariúna – SP: Embrapa Meio Ambiente, 2012. 155p. (Documentos / Embrapa Meio Ambiente; 88).
- BRUNETTA, J. M. F. C. et al. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 34, n. 3, p. 399-406. 2010
- CARVALHO, D. D. C. et al. **Isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *Fusarium oxysporum***. Comunicado Técnico 178: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 5p.
- CARVALHO, D. D. C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 28-34. 2011.
- CHANWAY, C. P. et al. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 133, n. 1, p. 81-88. 2000.
- CHEN, H.; CHEN, Z. J.; WU, M. B.; DENG, S. X. Screening the *Fusarium graminearum* inhibitory mutant strain from *Bacillus subtilis* by atmospheric-pressure plasma jet. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 1, p. 96-103. 2010.
- CILLIERS, A. J.; SWART, W. J.; WINGFIELD, M. J. A review of *Lasiodiplodia theobromae* with particular reference to its occurrence on coniferous seeds. **South African Forestry Journal**, Pretoria, n. 166, p. 47-52, 1993.
- DREADEN, T. J.; SMITH, J. A.; BARNARD, E. L.; BLAKESLEE, G. Development and evaluation of a real-time PCR seed lot-screening method for *Fusarium circinatum*, causal agent of pitch canker disease. **Forest Pathology**, v. 42, p. 405-411, 2012.
- DUNLAP, C. A. Cyclic lipopeptide profile of three *Bacillus subtilis* strains; antagonists of *Fusarium* head blight. **The Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 49, n. 4, p. 603-609. 2011.
- FRAEDRICH, S. W.; MILLER, T.; ZARNOCH, S. J. Factors affecting the incidence of black seed rot in slash pine. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 24, n. 8, p. 1717-1725, 1994.
- GALE, L. R. Population biology of *Fusarium* species causing head blight of grain crops. In: Leonard, K. J.; Bushnell, W. R. (Ed.). **Fusarium head blight of wheat and barley**. St. Paul: APS Press, p. 120-143. 2003.

IOOS, R.; FOURRIER, C.; IANCU, G.; GORDON, T. R. Sensitive Detection of *Fusarium circinatum* in Pine Seed by Combining an Enrichment Procedure with a Real-Time Polymerase Chain Reaction Using Dual-Labeled Probe Chemistry. **Phytopathology**, v. 99, n. 5, p. 582-590. 2009.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. **Doenças dos pinheiros (*Pinus* spp.)**. In: KIMATI, H. et al. Manual de Fitopatologia, 4. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 2005, v. 2, p. 517-522.

KRUGNER, T. L.; CARVALHO, P. G. T.; GALLI, F. Nota prévia sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. em *Pinus elliottii* Engelm. **O Solo**, Piracicaba, v. 62, n. 1. p. 45-48. 1970.

LANDERAS, E. et al. Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in Northern Spain. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 89, n. 9, p. 1015.2005.

LAZREG, F. et al. First report of *Fusarium acuminatum* causing damping-off disease on *Aleppo pine* in Algeria. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 4, p. 557.2013.

LAZREG, F. et al. First report of *Fusarium redolens* as a causal agent of *Aleppo pine* damping-off in Algeria. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 97, n. 7, p. 997.2. 2013.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* laboratory manual**. 1. ed. Blackwell Publishing: USA. 2006. 388 p.

LIMA, J. S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. **Summa Phytopathologica**, v. 39, n. 2, p. 81-88. 2013.

LIMA, J. S.; CARDOSO, J. E.; MOREIRA, R. C.; ALVES, E. S.; MELO, J. G. M. Caracterização cultural de isolados de *Lasiodiplodia theobromae* e patogenicidade em plantas de aceroleira. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 6, n. 1, p. 9-16. 2012.

LORI, G. A.; SALERNO, M. I. *Fusarium* species on seeds of *Pinus taeda* L. and *Pinus elliottii* I Engelm. In Argentina. Centro de Investigaciones de Fitopatología. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [S.l.], v. 110, n. 5, p. 437-443.2003.

MAFIA, R. G. et al. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, v. 29, n. 6, p. 843-851. 2005.

MARTÍN-PINTO, P.; PAJARES, J.; DÍEZ, J. Pathogenicity of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium oxysporum* on *Pinus nigra* seedlings in northwest Spain. **Forest Pathology**, [S.l.], v. 38, p. 78-82. 2008.

MORADI, H. et al. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics Journal**, v. 5, n. 2, p. 68-74. 2012.

MORSY, E. M. et al. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 47-57. 2009.

NIHORIMBERE, V. et al. Beneficial effects of *Bacillus subtilis* on field-grown tomato in Burundi: Reduction of local *Fusarium* disease and growth promotion. **African Journal of Microbiology Research**, [S.l.], v. 4, n. 11, p. 1135-1142.2010.

OLIVEIRA, I. et al. Aplicação de métodos moleculares na avaliação da diversidade de fungos entomopatogênicos da traça da oliveira. Curso Análise Genética e Molecular – Escola Superior Agrária do Instituto Politécnica de Bragança: Aplicação nas áreas medicinal, 86 forense, ambiental, agronômica, animal e alimentar – **Resumo das comunicações**: Bragança, 2011, 27 p.

PFENNING, L. H.; COSTA, S. S.; MELO, M. P.; COSTA, H.; VENTURA, J. A.; AUER, C. G.; SANTOS, A. F. First report and characterization of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pitch canker in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, p. 210-216. 2014.

POLETTI, T. MACIEL, C. G.; MUNIZ, M. F. B.; BRIOSO, P. S. T. First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. **Plant Disease**, Saint Paul, DOI: 10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN, 2016.

RU, Z.; DI, W. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. **African Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 11, n. 18, p. 4180-4186. 2012.

SCHILLING, A. G.; MOLLER, E. M.; GEIGER, H. H. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 86, n. 5, p. 515-522.1996.

SCHWEIGKOFER, W.; O'DONNELL, K.; GARBELOTTO, M. Detection and quantification of airborne conidia of *Fusarium circinatum*, the causal agent of pine pitch canker, from California sites by using a real time PCR approach combined with a simple spore trapping method. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3512-3520. 2004.

SHAHBAZ, M., Z.; IQBAL, A.; SALLEM, M. A. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). **Pakistan Journal Botany**, n. 41, v. 1, p. 359-368. 2009.

TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem e à mancha-de-*Cylindrocladium*, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp.** 2001. 67f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG: 2001.

TEIXEIRA, D. A. et al. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 4, p. 350-356. 2005.

VILJOEN, A. et al. Characterization of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. **Mycological Research**, Cambridge, v. 101, p. 437-445. 1997.

WANG, B. et al. Effects of novel bioorganic fertilizer produced by *Bacillus amyloliquefaciens* W19 on antagonism of *Fusarium* wilt of banana. **Biol Fertil Soils**, v. 49, p. 435-446. 2013.

WINGFIELD, M. J. et al. Pitch canker caused by *Fusarium circinatum*-- a growing threat to pine plantations and forests worldwide. **Australasian Plant Pathology**, [S.l.], v. 37, p. 319-334. 2008.

ANEXOS

ANEXO A – Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho.

Meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA)

- 200 g de batatas descascadas e fatiadas;
- 20 g de dextrose;
- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio de cultura.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

Meio de cultura Folha de Cravo – Ágar (FCA ou CLA)

- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- folhas de cravo (*Dianthus caryophyllus*) (distribuídas na placa de Petri antes de verter o meio).

NELSON, P. E.; TOUSSON, T. A.; MARASAS, W. F. O. Fusarium Species: an Illustrated Manual for Identification. Philadelphia: Pennsylvania State University Press, 1983. 193 p.

Meio de cultura acícula de *Pinus* – ágar

- 15 g de ágar;
- 1 L
- acículas de *Pinus* (distribuídas na placa de Petri antes de verter o meio).

LIMA, J.S.; MOREIRA, R. C.; CARDOSO, J. E.; MARTINS, M. V. V.; VIANA, F. M. P. Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. Summa Phytopathologica. 2013, v. 39, n.2, p. 81-88.

Meio de cultura Ágar-água (AA)

- 17 g de Ágar;
- 1 L de água destilada;

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. Basic Plant Pathology Methods. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434 p.

ANEXO B – Descrição dos produtos comerciais utilizados no trabalho.

QUALITY[®] é um fungicida microbiológico baseado em uma cepa de *Trichoderma asperellum* na concentração de 10^{10} UFCs g⁻¹. Formulação em grânulos dispersáveis de fácil manuseio, armazenamento e transporte. Indicado para o manejo de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. e *Rhizoctonia solani*. A aplicação pode ser feita via irrigação, tratamento de sementes e pulverização. Apresenta certificação para utilização na agricultura orgânica através da IMO Control. Informações obtidas no rótulo do produto.

ICB NUTRISOLO[®] é um inoculante a base de propágulos de *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum* e *T. koningiopsis*, na concentração de 10^{11} UFC/mL. Disponível na forma de líquido e recomendado para a cultura da alface (*Lactuca sativa* L.). Informações obtidas no rótulo do produto.

TRICHODERMIL[®] é um fungicida biológico composto de linhagem selecionada do fungo *Trichoderma harzianum*, denominada ESALQ 1306. Indicado para diversas culturas para controle de fungos de solo, causadores de doenças como: *Rhizoctonia*, *Fusarium* e *Sclerotinia*, sendo recomendado para aplicação preventiva através de pulverização, sulco de plantio, tratamento de sementes e irrigação via pivô. Informações obtidas no site de comercialização do produto.

TRICHODEL[®] é um produto biológico composto de linhagens selecionadas do fungo *Trichoderma* spp., que inibem o desenvolvimento de fungos patogênicos presentes no solo e sobre as plantas. Está disponível nas formulações 1×10^9 de células viáveis por grama (formulação em pó), e 1×10^9 de células viáveis por ml (Líquido - não oleoso). Informações obtidas no site de comercialização do produto.

RIZOS[®] é um inoculante que tem como princípio ativo *Bacillus subtilis*, na concentração de 5×10^9 ufc/mL. Indicado para tratamento de sementes de algodão, feijão, girassol, milho e soja; e aplicação via sulco ou pulverização para hortaliças. Informações obtidas no site de comercialização do produto.

RIZOLYPTUS® é um inoculante biológico indicado para otimizar o enraizamento de estacas de eucálio, tem como princípio ativo 10^8 células viáveis/mL da rizobactéria promotora do crescimento *Bacillus subtilis* (UFV – 3918. Registro no Mapa nº SP- 00581 10010-7). Pode ser aplicado, misturado com a água utilizada para o umedecimento do substrato (1 l de Rizolyptus® 50 l^{-1} de substrato). Informações obtidas no rótulo do produto.

CAROLINA SOIL® é um substrato orgânico para plantas, indicado para a fase inicial de produção de mudas. Composição: turfa de Sphagno, vermiculita expandida, calcário dolomítico, gesso agrícola e fertilizante NKP. Com pH igual a 5,0 e densidade de 101 Kg m^{-3} . Informações obtidas no rótulo do produto.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Dados referentes aos testes preliminares de qualidade fisiológica e sanitária dos lotes de sementes de *Pinus* spp. utilizados no presente estudo.

Tabela 1 – Identificação dos lotes de sementes de *Pinus* spp. utilizados no presente estudo.

Espécie	Código	Origem	Ano de coleta
<i>P. elliottii</i>	Lot 1	Ijuí - RS	2013
<i>P. elliottii</i>	Lot 2	Ijuí - RS	2013
<i>P. taeda</i>	Lot 3	Ijuí - RS	2013
<i>P. taeda</i>	Lot 4	Ijuí - RS	2013
<i>P. elliottii</i>	SP	São Paulo - SP	2013

Tabela 2 – Índice de velocidade de emergência (IVG) e percentual de emergência (G), de plântulas normais (PN), de plântulas anormais (PA) e de sementes não germinadas (SNG) de *Pinus* spp. dos quatro lotes avaliados.

Procedências	Variáveis				
	IVG	G	PN	PA	SNG
<i>P. elliottii</i> – Lot1	16,34 a	78 ^{ns}	76 ^{ns}	2 ^{ns}	22 ^{ns}
<i>P. elliottii</i> – Lot2	15,30 a	75	72	3	25
<i>P. taeda</i> - Lot3	9,65 b	71	60	11	29
<i>P. taeda</i> – Lot4	13,85 ab	73	72	1	27
C.V. (%)	18,87	10,38	11,43	73,03	27,37

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. C.V: coeficiente de variação; ^{ns}: não significativo pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 3 – Gêneros fúngicos (%) identificados associados aos quatro lotes de sementes de *Pinus* spp. avaliados.

Procedências	Gêneros fúngicos (%)				
	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Trichoderma</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>P. elliottii</i> - Lot1	9 ^{ns}	0 a*	83 ^{ns}	0 ^{ns}	0 ^{ns}
<i>P. elliottii</i> - Lot2	15	3 a	7	0	0
<i>P. taeda</i> - Lot3	43	13 b	12	2	1
<i>P. taeda</i> - Lot4	33	2 a	4	1	6
C.V. (%)	85,29	65,42	31,27	23,50	86,75

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. C.V: coeficiente de variação. ^{ns}: não significativo pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4 - Presença (+) ou ausência (-) de *Fusarium* spp. em quatro lotes de sementes de *Pinus* spp. através da PCR, com primers¹ da região ITS.

Lotes amostrados	<i>Fusarium</i> spp.
<i>P. elliottii</i> – Lot1	+
<i>P. elliottii</i> – Lot2	-
<i>P. taeda</i> – Lot3	+
<i>P. taeda</i> – Lot4	+

¹ Fus ITS F227-251 (5' GTG AAT CAT CGA ATC TTT GAA CGC A – 3') e Fus ITS R368-386: (5' CTA TGG AAG CTC GAC GTG A – 3').

Tabela 5 – Características de isolados fúngicos identificados associados a sementes de *Pinus* spp.

Isolado	Espécie	Origem	Acesso no GenBank
UFSMF1	<i>F. verticillioides</i>	Plântula de <i>P. elliottii</i> Lot1	KU170705 ¹
UFSMF2	<i>F. oxysporum</i>	Plântula de <i>P. taeda</i> Lot4	KU170704 ¹
BOT1UFSM	<i>L. theobromae</i>	Sementes de <i>P. taeda</i> Lot4	KF924398 ²
BOT2UFSM	<i>L. theobromae</i>	Sementes de <i>P. taeda</i> Lot3	KF924398 ²

¹ - Código no banco de dados referente a região EF-1 α ; ² - Código no banco de dados referente a região I