

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

***Fusarium sambucinum* ASSOCIADO A SEMENTES DE
Pinus elliottii: PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA,
FILOGENIA MOLECULAR E CONTROLE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caciara Gonzatto Maciel

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

***Fusarium sambucinum* ASSOCIADO A SEMENTES DE *Pinus
elliottii*: PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA, FILOGENIA
MOLECULAR E CONTROLE**

Caciara Gonzatto Maciel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Proteção Florestal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Florestal.**

Orientadora: Prof^a. Marlove Fátima Brião Muniz

Santa Maria, RS, Brasil.

2012

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

Gonzatto Maciel, Caciara
Fusarium sambucinum ASSOCIADO A SEMENTES DE Pinus
elliottii: PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA, FILOGENIA
MOLECULAR E CONTROLE / Caciara Gonzatto Maciel.-2012.
93 p.; 30cm

Orientadora: Marlove Fátima Brião Muniz
Coorientadores: Lia Rejane Silveira Reiniger,
Maristela Machado Araújo
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Florestal, RS, 2012

1. Microbiolização de sementes 2. Bacillus subtilis 3.
Trichoderma spp. I. Brião Muniz, Marlove Fátima II.
Silveira Reiniger, Lia Rejane III. Machado Araújo,
Maristela IV. Título.

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

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a dissertação de mestrado

***Fusarium sambucinum* ASSOCIADO A SEMENTES DE *Pinus elliottii*:
PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA, FILOGENIA MOLECULAR E
CONTROLE**

elaborada por
Caciara Gonzatto Maciel

**Como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Engenharia Florestal**


Comissão examinadora



Marlove Fátima Brião Muniz, Dr.^a.
(Presidente/Orientadora)



Luciana Magda de Oliveira, Dr.^a. (UDESC)



Igor Poletto, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria, 16 de Julho de 2012.

*Aos meus amados pais, Carlos Antônio e Leonilda Fátima, por serem
minha fonte de inspiração diária.
E ao meu adorado avô, Antenor Pedro Gonzatto (in memoriam), que
sempre sonhou ter um (a) neto (a) doutor (a). Agora falta pouco, Vô!*

Dedico-lhes esse trabalho.

Agradecimentos

A Universidade Federal de Santa Maria que, através do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, possibilitou a realização desse trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado.

À Professora Dr^a. Marlove Fátima Brião Muniz, pela orientação, disponibilidade, compreensão e amizade prestada sempre que necessário.

Às Professoras Lia Reiniger e Maristela Araújo, pela co-orientação e disponibilidade sempre que solicitadas.

À banca examinadora, constituída pela Prof^a. Luciana M. de Oliveira e pelo Prof^o. Igor Poletto.

À querida secretária do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Cerlene Machado, pela disponibilidade e amizade.

À toda minha grande família, tios, tias, primos, primas e, especialmente, ao meu irmão Dassaiévis e minha vó, Maria, por todas as vibrações positivas transmitidas.

Ao meu namorado, Rogério Gonzatto, pelo carinho, compreensão e ajuda durante esses dois anos.

Às queridas colegas, Marília Lazarotto e Paola Milanesi, pela ajuda com a caracterização molecular e morfológica do “*Fusarium*”.

Às colegas Clair Walker e Marciéli Bovolini pela disponibilidade e amizade oferecidas durante a execução desse trabalho.

Aos demais colegas do laboratório de Fitopatologia: Ricardo Mezzomo, Vinicius Fantinel, Graziela Piveta, Gisele Noal, Geísa Finger, Ricardo dos Santos, Carisiane Jaroczewki, Camila Pollet, Daniele Brum, Daniele Cardoso, Emanuele Junges, Leíse Hekcler, Cláudia Dutra, Tales Poletto, Bruna Bastos, Janíne Pedroso, Gerarda Beatriz, Fábio Hamann, Jucéli Müller e Johnathan Rodrigues, Patrícia Migliorini.

Aos funcionários do Departamento de Defesa Fitossanitária, Mari, Fernando Cognato e, especialmente, Maria Nevis Weber pelos ensinamentos, amizade e carinho durante todos os anos de convivência.

A todos os meus amigos, em especial, as Eng. Florestais Karla Campanholo, Rosana Guma e Miriam Rodrigues, minhas queridas.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

***Fusarium sambucinum* ASSOCIADO A SEMENTES DE *Pinus elliottii*: PATOGENICIDADE, MORFOLOGIA, FILOGENIA MOLECULAR E CONTROLE**

AUTORA: CACIARA GONZATTO MACIEL
ORIENTADORA: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
SANTA MARIA, 16 DE JULHO DE 2012

Pinus elliottii é uma espécie de importância no setor florestal e que apresenta vulnerabilidade na qualidade sanitária de suas sementes, especialmente pela associação de *Fusarium* spp., responsável por perdas de plântulas no viveiro. O presente trabalho tem como objetivo determinar o método adequado para avaliar a patogenicidade de *Fusarium* spp. associado a sementes de *P. elliottii* e caracterizar morfológica e molecularmente o patógeno em nível de espécie, bem como verificar a eficiência do controle biológico *in vitro* e *in vivo* do fungo. Para patogenicidade foram aplicados diferentes tratamentos: T1- Contato + *Fusarium* sp.; T2 - Peliculização + Contato + *Fusarium* sp.; T3 - Peliculização + *Fusarium* sp.; T4 – Peliculização; T5 - Contato com meio BDA e T6 - Sem tratamento. A caracterização morfológica foi realizada, utilizando uma chave de identificação específica para o gênero *Fusarium*, e para a identificação molecular, foram sequenciadas três regiões genômicas do isolado, sendo elas: ITS, fator de alongação 1- α e beta-tubulina. Nos testes de controle biológico utilizou-se *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis*, nas formas comerciais Agrotrich Plus[®] e Rizolyptus[®], respectivamente. Os testes de controle *in vitro* foram realizados pelo método de confronto pareado de culturas (antagonista x patógeno) e os testes *in vivo*, foram desenvolvidos em condições de viveiro. A espécie de *Fusarium* identificada nas sementes foi caracterizada como *Fusarium sambucinum*, patogênico a *P. elliottii*, quando inoculado via contato com a cultura fúngica por 48 horas. A microbiolização das sementes com Rizolyptus[®] e Agrotrich Plus[®] promoveu incremento no potencial germinativo e, no caso do Agrotrich Plus[®], reduziu a incidência de fungos apodrecedores como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Os antagonistas foram eficientes no controle *in vitro* de *F. sambucinum* e, no teste de biocontrole *in vivo*, o produto Rizolyptus[®] destacou-se, reduzindo as perdas de plântulas causadas pelo patógeno, assim como, potencializando as variáveis de comprimento de plântula, massa verde e massa seca.

Palavras-chave: microbiolização; *Bacillus subtilis*; *Trichoderma* spp.

ABSTRACT

Master thesis
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal
Universidade Federal de Santa Maria

***Fusarium sambucinum* ASSOCIATED TO SEEDS OF *Pinus elliottii*: PATHOGENICITY, MORPHOLOGY, MOLECULAR PHYLOGENY AND CONTROL**

AUTHOR: CACIARA GONZATTO MACIEL
ADVISOR: MARLOVE FÁTIMA BRIÃO MUNIZ
Santa Maria, July 16th, 2012

Pinus elliottii is an important forestal culture, whose seeds, in terms of health quality, display high vulnerability to fungal pathogenic agents, especially to the association of especially by association of *Fusarium* spp. which is a responsible agent for seedlings losses in the nursery. This study aims to determine the appropriate method to assess the pathogenicity of *Fusarium* sp. associated with seeds of *P. elliottii*, and characterize the fungus, morphological- and molecularly, on its species level, as well as to verify the efficiency of its *in vitro* and *in vivo* biological control. Pathogenicity to different treatments were applied: T1 - Contact + *Fusarium* sp.; T2 - Contact + film coating + *Fusarium* sp.; T3 - film coating + *Fusarium* sp.; T4 – film coating; T5 - Contact PDA and T6 - No treatment. Morphological characterization was performed using a specific identification key for the genus *Fusarium*, and the molecular identification, we sequenced three genomic regions of isolate, which are: ITS, elongation factor 1- α and beta-tubulin. In tests of biological control used is *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* in the commercial forms Agrotich Plus[®] and Rizolyptus[®], respectively. The control tests were performed *in vitro* by the method of paired comparison of cultures (pathogen x antagonist) and *in vivo* tests were carried out in nursery conditions. *Fusarium*'s species that was identified on the seeds was characterized as *Fusarium sambucinum*, which is pathogenic to *P. elliottii*, when the seeds are inoculated via contact to the fungal culture during 48 hours. Microbilization of seeds with *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. provided improvement on the germination potential of them, and, in the case of Agrotich Plus[®], reduced the incidence of rot agent fungi, such as *Penicillium* sp. and *Aspergillus* sp.. The antagonistic agents were efficient on the *in vitro* control of *F. sambucinum*. Rizolyptus[®] stood out against the pathogen on the *in vivo* biocontrol test; it reduced seedlings losses and increased values of their length, as well as, of their green and dry masses.

Key-works: microbiolization, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma* spp.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios de primeira contagem de emergência (PCE), emergência (E28), plântulas anormais sintomáticas (PAS), sementes mortas (SM) e comprimento de plântula (CP) de sementes de <i>Pinus elliottii</i> , após diferentes formas de inoculação de <i>Fusarium</i> sp....	44
Tabela 2 - Incidência média (%) de fungos em sementes de <i>Pinus elliottii</i> após diferentes formas de inoculação de <i>Fusarium</i> sp.	46
Tabela 3 - Características morfológicas de <i>Fusarium sambucinum</i> isolado a partir de sementes de <i>Pinus elliottii</i>	48
Tabela 4 - Acesso no <i>Genbank</i> , cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.	51
Tabela 5 - Acesso no <i>Genbank</i> , cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α ...	53
Tabela 6 – Acesso no <i>Genbank</i> , cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região beta – tubulina.	54
Tabela 7 - Valores médios de primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) de <i>Pinus elliottii</i> , após diferentes formas de microbiolização.	56
Tabela 8 - Avaliação da qualidade de plântulas de <i>Pinus elliottii</i> , obtidas de sementes microbiolizadas, através das variáveis: emergência aos 28 dias (E28), sementes não germinadas (SNG), comprimento de plântulas (CP), massa verde (MV) e massa seca (MS).	58
Tabela 9 - Incidência média de fungos em sementes de <i>Pinus elliottii</i> após diferentes formas de microbiolização.....	59
Tabela 10 - Contrastes ortogonais (Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5) entre as médias dos grupos de 11 tratamentos para variáveis do teste de emergência em viveiro de sementes de <i>Pinus elliottii</i> ,	

submetidas à microbiolização: emergência aos 28 dias (E28), sementes não germinadas (SNG), comprimento de plântula (CP), massa verde (MV) e massa seca (MS).	61
Tabela 11 - Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de <i>Pinus elliottii</i> , através das variáveis: emergência aos sete (E7), emergência aos 21 (E21) e emergência aos 42 dias (E42), plântulas tombadas (PT) e sementes não germinadas (SNG).....	68
Tabela 12 - Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de <i>Pinus elliottii</i> , através das variáveis: comprimento da parte aérea (PA), comprimento da parte radicular (PR), comprimento total (CT), massa verde (MV) e massa seca (MS).	69
Tabela 13 - Contrastes ortogonais (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 e Y6) entre as médias dos grupos de nove tratamentos para variáveis do teste de emergência em viveiro de sementes de <i>Pinus elliottii</i> inoculadas com <i>Fusarium sambucinum</i> e submetidas à microbiolização: emergência aos 42 dias (E42), plântulas tombadas (PT), sementes não germinadas (SNG), comprimento total de plântula (CT) massa verde (MV) e massa seca (MS).	72
Tabela 14 - Diluições de substrato. Presença (+) e ausência (-) de <i>Trichoderma</i> spp. e <i>Fusarium sambucinum</i> nos diferentes tratamentos.	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Organização dos tratamentos do teste de patogenicidade em sementes de <i>Pinus elliotii</i>	32
Quadro 2 - Organização dos tratamentos no teste de microbiolização de sementes de <i>Pinus elliotii</i>	38
Quadro 3 - Organização dos tratamentos do teste de biocontrole dos produtos Agrotich Plus® e Rizolyptus® in vivo sobre <i>F. sambucinum</i>	40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Organização do teste de confronto direto. A: *Fusarium sambucinum* (F) x *Trichoderma* spp. (T). B: *Fusarium sambucinum* (F) x *Bacillus subtilis* (B). 39
- Figura 2 - Sintomas observados em plântulas no teste de patogenicidade. Apodrecimento dos cotilédones sem o desprendimento completo do tegumento (A); murcha da plântula sem o desenvolvimento inicial da parte aérea, tecido com aspecto apodrecido (B) lesão e posterior ruptura do hipocótilo (C). 45
- Figura 3 - Características morfológicas de *Fusarium sambucinum*. Cultura em meio BDA (A); medida microscópica de macroconídio (B); esporodóquio em meio FCA (C); macroconídios (D); estruturas de resistência (clamidósporos) (E) e conidióforo em monofialide (F). 49
- Figura 4 – Análise de regressão para diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial de *Fusarium sambucinum* em meio BDA, incubado a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. 50
- Figura 5 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). * Isolado de *Fusarium* sp. obtido no presente trabalho. 52
- Figura 6 – Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1 – α . Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). * Isolado de *Fusarium* sp. obtido no presente trabalho. 53
- Figura 7 – Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região beta - tubulina. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). * Isolado de *Fusarium* sp. obtido no presente trabalho. 55

Figura 8 - Crescimento micelial (mm) de *Fusarium sambucinum* no confronto direto: *F. sambucinum* x *Trichoderma* spp. e *F. sambucinum* x *Bacillus subtilis*; e testemunhas: apenas *F. sambucinum*, apenas *Trichoderma* spp. e apenas *B. subtilis*..... 63

Figura 9 – Confronto direto *in vitro*: *Fusarium sambucinum* x *Trichoderma* spp. (A); testemunha (B); *F. sambucinum* x *Bacillus subtilis* (C); testemunha (D). Após três e seis dias de incubação a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas, respectivamente, para *Trichoderma* spp. e *B. subtilis*. 64

Figura 10 – Fragmentos de *Pinus elliottii* em câmara úmida (BDA e papel-filtro) após teste de biocontrole. T7 – Peliculização + *Fusarium sambucinum* x Agrotich Plus®; T5 - Peliculização + *F. sambucinum* x Contato + Agrotich Plus®; T2 – Contato + *F. sambucinum* x Contato + Rizolyptus® e T1 – Contato + *F. sambucinum*. 67

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 - Descrição dos meios de cultura utilizados no trabalho.	92
ANEXO 2 - Descrição dos produtos comerciais utilizados no trabalho.	93

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	16
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 <i>Pinus elliottii</i> Engelm.....	18
2.2 Qualidade sanitária da semente.....	19
2.3 <i>Fusarium</i> sp.....	21
2.4 Controle biológico.....	22
2.5 Microbiolização de sementes	23
2.5.1 <i>Trichoderma</i> spp.	24
2.5.2 <i>Bacillus subtilis</i>	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Origem das sementes e local dos experimentos.....	28
3.2 Caracterização inicial da qualidade fisiológica e sanitária das sementes de <i>Pinus elliottii</i> 28	
3.2.1 Teor de água.....	28
3.2.2 Germinação e Primeira Contagem de Germinação	29
3.2.3 Sanidade	29
3.3 Teste de transmissão de fungos via semente.....	30
3.4 Avaliação da patogenicidade de <i>Fusarium</i> sp. associado a sementes de <i>Pinus elliottii</i> por meio de diferentes métodos de inoculação.....	30

3.4.1 Isolamento do fungo.....	30
3.4.2 Inoculação de <i>Fusarium</i> sp. nas sementes	31
3.4.3 Caracterização morfológica do isolado.....	33
3.4.4 Caracterização molecular do isolado patogênico.....	34
3.5 Microbiolização em sementes de <i>Pinus elliottii</i>	36
3.5.1 Produtos utilizados.....	36
3.5.2 Inoculação dos bioprotetores	36
3.6 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotrich Plus® e Rizolyptus® <i>in vitro</i> sobre <i>Fusarium sambucinum</i>	38
3.7 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotrich Plus® e Rizolyptus® <i>in vivo</i> sobre <i>Fusarium sambucinum</i>	39
3.7.1 População de fungos no substrato.....	41
3.8 Procedimentos estatísticos	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	42
4.1 Caracterização inicial das sementes.....	42
4.2 Teste de transmissão de fungos via semente.....	42
4.3 Avaliação da patogenicidade de <i>Fusarium</i> sp. associado a sementes de <i>Pinus elliottii</i> através de diferentes métodos de inoculação.....	43
4.4 Caracterização do isolado <i>Fusarium</i> sp.	47
4.4.1 Caracterização morfológica	47
4.4.2 Caracterização molecular.....	50
4.5 Microbiolização em sementes de <i>Pinus elliottii</i>	55
4.6 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotrich Plus® e Rizolyptus® <i>in vitro</i> sobre <i>Fusarium sambucinum</i>	62
4.7 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotrich Plus® e Rizolyptus® <i>in vivo</i> sobre <i>Fusarium sambucinum</i>	64
5 CONCLUSÕES.....	74
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

INTRODUÇÃO

A produção de madeira através de florestas plantadas, atualmente, visa a substituir a exploração das florestas naturais. As principais espécies usadas em reflorestamentos no Brasil são os gêneros *Eucalyptus*, *Pinus* e *Acacia*.

Segundo Harlow; Harrar (1969), o gênero *Pinus* é o maior e mais importante das coníferas, incluindo noventa espécies que ocorrem na América do Norte, na Europa, no Sul da Ásia, no Norte da África, na Ásia Menor, na Malásia e em Sumatra, com uma espécie no Equador. A área plantada com pinus, no Brasil, atinge 1.756.359 ha, e está concentrada, principalmente, na região sul do país (79,8%), devido às condições edafoclimáticas e à localização dos principais centros processadores desse tipo de madeira (Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas, 2001). As mudas de *Pinus* podem ser produzidas via sexuada (sementes) e assexuada, sendo a primeira utilizada como a base nos plantios florestais.

A qualidade da semente é fundamental para evitar plantios desuniformes e a ocorrência de doenças no estágio inicial de desenvolvimento da planta. De acordo com Carneiro (1987), os patógenos podem ser transmitidos ainda no campo ou durante os processos de beneficiamento, ocasionando uma severa redução na capacidade germinativa das sementes, bem como um possível tombamento das mudas em pós-emergência. Entre os gêneros fúngicos encontrados associados a sementes de *Pinus elliottii*, Lasca et al. (1978) identificaram *Pestalotiopsis*, *Fusarium*, *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Trichothecium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Chaetomium*, *Rhizopus* e *Penicillium*.

Espécies de *Fusarium* vêm sendo identificadas causando danos ao gênero *Pinus* no Brasil (VENTURA, 1999), principalmente em sementes e em plântulas (tombamento de mudas) (MENDES et al., 1998). Homechin et al. (1986) constataram *F. moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. semitectum* em lotes nacionais de sementes de *P. elliottii* var. *elliottii* e *F. oxysporum* em sementes de *P. taeda*. A identificação de espécies de *Fusarium* 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 desse gênero (NELSON, 1983; VENTURA, 2000). Porém, na atualidade, a reação da polimerase em cadeia (PCR) tem auxiliado na identificação de espécies de *Fusarium* (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 ITS (internal transcribed spacer), 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 - espécies.

O tratamento de sementes florestais, embora pouco estudado, é uma ferramenta fundamental para diminuir a incidência de doenças nas fases de emergência, podendo contribuir para a redução ou a erradicação da doença na área e também evitando a entrada de patógenos em áreas ainda não infestadas (MORAES, 2004). Devido às restrições com o 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. O uso de microrganismos antagonistas no tratamento de sementes, denominado microbiolização de sementes (LUZ, 1993), tem-se mostrado eficiente no controle de patógenos associados a elas, em especial para espécies agrícolas (LUDWIG, 2009).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho é determinar o método adequado para avaliar a patogenicidade de *Fusarium* sp. associado a sementes de *P. Elliottii* e caracterizar morfológica e molecularmente o patógeno em nível de espécie, bem como verificar a eficiência do controle biológico *in vitro* e *in vivo* do fungo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pinus elliottii* Engelm

Pinus elliottii Engelm, pertencente à família Pinaceae, é uma espécie que pode atingir de 15-30 m de altura, é nativa dos Estados Unidos (LORENZI et al., 2003), possui fustes retos de até 90 cm de diâmetro, a casca é espessa e disposta em placas que variam em tons marrom-avermelhados (BACKES; IRGANG, 2004). Apresenta folhas pontiagudas, semelhantes a agulhas, denominadas acículas, que podem organizar-se aos pares ou em grupos nos ramos e, segundo Marchiori (1996), a identificação de muitas espécies do gênero *Pinus* está associada às características de suas acículas.

As sementes dessa espécie são ovóides e levemente triangulares, aladas, de coloração preta ou com manchas (LORENZI et al., 2003), desenvolvem-se internamente nos cones, aproximadamente 10 g de sementes por estrutura, medindo entre dois a 15 mm de comprimento com dois a 10 mm de largura (SUASSUNA, 1977). As sementes utilizadas no sistema de produção de mudas devem ser oriundas de áreas baseadas em material genético selecionado (AUER et al., 2001), com árvores matrizes previamente determinadas, a fim de evitar posteriores problemas com patógenos ou deformações genéticas.

O *Pinus elliottii*, por ter ótima adaptação em solos arenosos e ao clima subtropical, vem sendo empregado com sucesso em áreas nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e sul de São Paulo. De acordo com Kronka et al. (2005), uma das razões mais importantes para a implantação de plantios de pinus no Brasil foi a necessidade da produção de madeira para o abastecimento industrial, a produção de madeira serrada, madeira laminada, para a confecção de painéis e a produção de celulose e papel.

Por apresentar uma madeira leve e fácil de ser trabalhada, o pinus foi, aos poucos, substituindo as madeiras nativas na maior parte das aplicações, evitando, assim, a exploração intensiva e irregular de algumas espécies, como é o caso da *Araucaria angustifolia* (pinheiro do Paraná). Os dados da Pesquisa do IBGE sobre Extração Vegetal e Silvicultura, no ano de 2010, mostram que o Brasil tem conseguido aumentar a produção de madeira e lenha a partir de florestas plantadas, ao mesmo tempo em que há uma queda na produção extraída diretamente da natureza. Com essa tendência, pode-se verificar um aumento da proporção do

segmento da silvicultura (madeira extraída de florestas plantadas) no total da produção florestal brasileira (IBGE, 2010).

Os problemas fitossanitários encontrados em áreas de reflorestamento com pinus resumiam-se, inicialmente, à presença de formigas cortadeiras, o inseto *Sirex noctilio* (vespa da madeira) (KRONKA et al., 2005) e à armilariose causada pelo fungo *Armillaria* sp., constatada em coníferas (pinus e araucária) (AUER et al., 2001).

Com o crescimento das áreas de plantio, aumentou, conseqüentemente, a produção de mudas em viveiros, o que acarretou em um aumento no índice de doenças. Os fungos são os principais agentes causais e atuam, especialmente, nas fases iniciais do processo de produção de mudas, causando perdas econômicas significativas, podendo ser transmitidos via semente, causando danos em pré-emergência e pós-emergência. Carneiro (1987) relata a podridão do topo e a morte das acículas em mudas de pinus na sementeira, atribuídas ao ataque dos fungos *Helminthosporium sativum* e *Ascochyta piniperda*, e a redução no poder germinativo e podridão de sementes associada aos gêneros *Phoma* sp., *Phomopsis* sp. e *Trichotecium* sp. O autor cita o “*damping-off*” causado por fungos presentes no solo, tais como *Fusarium* e *Rhizoctonia*, como a doença mais agressiva no viveiro.

2.2 Qualidade sanitária da semente

A qualidade das sementes é o somatório dos atributos genéticos, físicos, fisiológicos e sanitários que afetam a sua capacidade de gerar plantas de alta produtividade (POPINIGIS, 1985). Dentre esses atributos, o aspecto sanitário da semente é um dos mais relevantes, em função dos patógenos apresentarem alta variabilidade, sendo necessários estudos constantes para acompanhar essa evolução.

Considerando os agentes patogênicos que podem associar-se às sementes, os fungos representam o maior grupo, seguido das bactérias e, em menor proporção, dos vírus e dos nematóides (MACHADO, 2000). Verifica-se que é cada vez maior o percentual de sementes florestais contaminadas por fungos, sejam eles saprófitas ou patogênicos, uma vez que, instalados na semente, são considerados, por Machado (2000), os agentes patogênicos mais ativos, tendo maior habilidade em penetrar diretamente nos tecidos vegetais e colonizá-los mais facilmente.

Dentre os gêneros de fungos saprófitas, que ocorrem mais frequentemente associados às sementes de espécies florestais, pode-se citar: *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Epicoccum*, *Monilia*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Periconia*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. E dentre os potencialmente patogênicos, estão: *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Diplodia*, *Dreschlera*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Rhizoctonia*, *Septoria* e *Verticillium* (SANTOS; GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER, 2000).

Em *Pinus taeda*, Golle (2007) apontou os seguintes gêneros fúngicos associados a sementes: *Aspergillus*, *Cercospora*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Pestalotia*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma*, sendo que *Fusarium* e *Penicillium* foram os de maior ocorrência. Carneiro (1987) e Santos et al. (2000) afirmam que os principais problemas ligados a esses patógenos ocorrem durante as fases de germinação e produção de mudas. Auer et al. (2001), por sua vez, identificaram esporos de *Fusarium oxysporum* em sementes de *Pinus elliottii*, que, ao serem semeadas, germinam e, posteriormente, sofrem tombamento em função do ataque do patógeno.

De acordo com Machado (1988), o fungo pode chegar até a semente através do vento, animais ou respingos de chuva, partindo de uma fonte externa que pode ser o solo ou uma planta hospedeira. Os fungos podem ser transmitidos às sementes durante o processo de extração do fruto (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977) e no período de manejo entre as sementes: coleta e semeadura. A semente é considerada infectada quando as estruturas do patógeno estão localizadas no interior de seus tecidos, na superfície e quando aderidas à mesma (MUNIZ; PORTO, 1999).

Embora pouco conhecida, a transmissão de organismos fitopatogênicos por sementes é uma das principais formas de contaminação (ARAÚJO, 2008). Na literatura, é possível encontrar exemplos de fungos que geralmente estão associados às sementes e, que podem ser transmitidos para plântulas, como: *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani* foram patogênicos às plântulas de *Bixa orellana* (SANTOS; ARAÚJO; BRUNO, 1992); *Phomopsis* sp. também causou redução da germinação e formação de sintomas em pós-emergência nas plântulas de *Dipteryx alata* (SANTOS et al., 1997); *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Alternaria* sp. e *Fusarium* sp. que interferiram no processo de produção de mudas de *Schizolobium parahyba*, *Cedrela fissilis*, *Enterolobium contortisiliquum* e *Sesbania virgata* (CHEROBINI, 2006); e *Cladosporium* sp., *Pestalotia* sp. e *Macrophomina* sp. que causaram queima foliar e morte de plântulas de *Blepharocalyx salicifolius* (REGO, 2008).

2.3 *Fusarium* sp.

O gênero *Fusarium* pertence à família *Nectriaceae*, ordem *Hypocreales*, classe *Sordariomycetes*, filo *Ascomycota*, classificado e descrito, pela primeira vez, pelo micólogo alemão Link, em 1809. Apresenta em torno de 775 espécies e subespécies, sendo encontrado no solo, no ar, nas plantas e nos alimentos (URBEN et al., 2009).

A ocorrência de *Fusarium* spp. é um dos problemas mais limitantes em viveiros, já que o fungo é habitante nativo do solo e com comportamento cosmopolita, portanto, de difícil controle. Existem relatos da associação desse patógeno com diversas espécies: escurecimento e deterioração do sistema radicular em erva-mate (POLETTI, 2008); declínio geral de plântulas de coníferas, necrose do sistema radicular e morte da plântula na sementeira (CARNEIRO, 1987); mortalidades em mudas de café em diferentes regiões do país (ZAMBOLIM et al., 2005); amarelecimento, murcha e necrose de mudas de bananeira (CORDEIRO et al., 2005); murcha vascular em plantas de algodoeiro (CIA; SALGADO, 2005); murcha no feijoeiro (PAULA JÚNIOR et al., 2008).

No gênero *Pinus*, a doença foi relatada, inicialmente, por Krugner et al. (1970) que associaram os sintomas de murcha e secamento apical em mudas de *Pinus elliottii* var. *elliottii* ao ataque da espécie *Fusarium oxysporum*. Grigoletti Júnior e Auer (2006) verificaram sintomas semelhantes em mudas de *Pinus taeda* de dois a cinco meses de idade, os sintomas são considerados reflexos, uma vez que o fungo ataca o sistema radicular da muda. Os autores ressaltam que a maneira como a muda entra em declínio assemelha-se com os danos causados por geada: secamento do ápice e curvatura do mesmo, no entanto, a visualização do sistema radicular permite o esclarecimento da dúvida, já que o ataque do patógeno torna as raízes enegrecidas. 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.

A necessidade da identificação das espécies de *Fusarium*, causadoras de determinadas doenças, exige estudos profundos na caracterização morfológica e molecular desses isolados. Três conceitos de espécie são envolvidos para identificação de *Fusarium*: o morfológico, baseado na similaridade dos caracteres observados, denominados de marcadores morfológicos; o biológico, baseado na compatibilidade sexual entre membros da mesma espécie; e o conceito de espécie filogenética, que é caracterizado com base na análise de sequências gênicas (O'DONNELL et al., 2000; SUMMERELL et al., 2006).

O conhecimento biológico da espécie, embora seja uma parte fundamental no processo de identificação, exige tempo, condições climáticas bem controladas (QUERALES, 2010) e, além disso, laboratórios devidamente equipados. Somente a caracterização morfológica não é suficiente para a determinação de uma espécie de *Fusarium*, pois a constante instabilidade morfológica do fungo torna as chaves de classificações controversas. A análise do DNA é uma ferramenta que facilita a caracterização, a identificação e a diagnose rápida de patógenos (WEISING et al., 1995), que vem complementando a caracterização morfológica, dando mais credibilidade ao processo de identificação da espécie.

2.4 Controle biológico

O controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado, de uma maneira simples, como a ação de um microrganismo sobre outro microrganismo (BETTIOL; GHINI, 2009), ou, de forma mais específica, como a redução do potencial de inóculo e efetividade de um patógeno, realizada por um ou mais microrganismos (COOK; BACKER, 1983). Os principais mecanismos dos agentes antagonistas, segundo Bettiol (1991), são parasitismo, competição, antibiose, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro.

É inegável a necessidade de estudar e aprimorar a utilização do controle biológico em plantas. As publicações científicas na área tiveram início em 1950, com trabalho de Reinaldo Foster sobre a inativação do vírus do mosaico do fumo com a utilização de um filtrado a base de *Trichoderma* spp., e seguem em grande escala nos dias atuais. No ano de 2009, mais de 20 produtos utilizados para o controle biológico já estavam disponíveis para os produtores (BETTIOL; GHINI, 2009).

Para confirmar se determinado microrganismo tem ação antagônica sobre outro, os testes *in vitro* e *in vivo* são indispensáveis. Os testes *in vitro* possuem as vantagens de possibilitar a análise de um grande número de potenciais antagonistas, permitir o estudo do mecanismo de ação e facilitar a observação das interações antagonista - patógeno (MARIANO, 1993), fazendo-o em um curto prazo de tempo e ocupando uma área relativamente pequena. Para Bell et al. (1982), são ferramentas importantes no processo de seleção dos isolados antagonistas mais eficientes no controle de determinado patógeno, com potencialidade para testes *in vivo*.

Testes de antagonismo *in vivo* são fundamentais para concretizar os testes em ambiente controlado, o objetivo é aproximar ao máximo possível às condições reais do processo de produção de mudas, como temperatura, umidade, precipitação e insolação. Nem sempre os resultados de biocontrole *in vivo* apresentam respostas positivas, já que variações na temperatura, umidade, luz e microflora do solo podem interagir com os microrganismos envolvidos. De acordo com Freitas; Pizzinato (1991; 1997), há muitos trabalhos que relatam ausência de correlação entre antagonismo *in vivo* e *in vitro*.

Sottero et al. (2006) observaram que, de 64 isolados de *Pseudomonas* sp. testados no controle *in vitro* de *Fusarium* sp., apenas 18% foram eficientes, e, entre esses, somente um obteve resultados promissores no controle da fusariose em alface *in vivo*. Lucon e Melo (1999) observaram que 94 isolados apresentaram atividade antagônica contra *Erwinia carotovora* *in vitro*, e cerca de 43% do total foi capaz de reduzir a severidade da doença em tubérculos de batata nos testes *in vivo*.

2.5 Microbiolização de sementes

A microbiolização de sementes consiste no seu recobrimento com microrganismos vivos antes da sementeira. Segundo Luz (1993), é um sistema adequado de introdução de bioprotetores para o controle das doenças nas sementes, formando a primeira barreira de defesa das plantas contra o ataque de microrganismos fitopatogênicos. Constitui um método alternativo, viável economicamente e que pode trazer benefícios para a cultura, por favorecer o equilíbrio microbiano do solo cultivado (MARTELLETO, 2005), uma vez que visa, tanto o controle dos patógenos associados às sementes, como àqueles veiculados pelo solo.

A técnica de microbiolização de sementes vem sendo empregada, principalmente, no controle dos patógenos causadores de podridões de sementes, tombamento e morte de plântulas. É considerada, desde 1937, em sua descoberta, até os dias atuais, como uma das mais eficientes medidas de controle biológico, tendo como principais alvos os gêneros fúngicos *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Phytium*, *Colletotrichum* e *Macrophomina* comumente transmitidos via sementes de diversas espécies de plantas (CARVALHO e NAGAWAVA, 2000). O uso da técnica contra bacterioses é menos comum, porém já existem relatos importantes como a doença galha da coroa, causada pela *Agrobacterium tumefaciens* que tem como principal forma de controle a microbiolização das sementes com a

Agrobacterium radiobacter (MICHEREFF, 2001). Moura et al. (1998) destacam a utilização de *Streptomyces* sp., via microbiolização, para o tratamento de *Ralstonia solanacearum* em tomate.

As principais vantagens da microbiolização dizem respeito aos microrganismos, por serem agentes biológicos cujos produtos são supostamente biodegradáveis, não têm produzido efeitos indesejáveis ao meio ambiente até o momento; atuam evitando que populações de pragas atinjam níveis danosos; apresentam menor custo de pesquisa para desenvolvimento dos protetores quando comparado com os químicos; por serem organismos vivos tendem a multiplicar-se no solo e permanecer beneficiando o substrato por um longo período. Por outro lado, demandam mais tempo para apresentar resultados de controle quando comparados com os químicos, e são susceptíveis a mutações genéticas, que exigem estudos mais específicos (MICHEREFF, 2001).

Os microrganismos antagonistas de maior importância, utilizados na microbiolização, são os gêneros fúngicos: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Aspergillus* e *Chaetomium*. Entre as bactérias estão as do gênero *Pseudomonas* (*P. putida* e *P. fluorescens*), *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp. e algumas representantes da família Enterobacteriaceae (SILVA et al., 2008).

2.5.1 *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. é um fungo imperfeito, pertencente à subdivisão *Deuteromycotina*, ordem *Hifomicetes* e família *Moniliaceae*. As espécies do fungo apresentam características muito semelhantes, que se sobrepõem dentro de um mesmo grupo ou seção, dificultando assim a classificação dos isolados (MELO, 1991), além de apresentarem ampla distribuição, sendo encontrados em distintos tipos de solo.

Em meio de cultura, as colônias de *Trichoderma* spp. apresentam crescimento rápido, com coloração inicial quase que hialina que evolui para um aspecto flocoso de pigmentação esverdeada. Em conformidade com Ethur (2006), a variação na coloração ocorre em função do tipo e da quantidade de conídios e pH do meio de cultivo. O micélio é composto por hifas muito ramificadas e de parede lisa, sendo comum a presença de clamidósporos, intercalados nas hifas ou em estruturas terminais (MELO, 1991; HOWEL, 2003).

O gênero *Trichoderma* é considerado um dos mais promissores agentes antagônicos. Sua ação está relacionada aos mecanismos de antibiose, hiperparasitismo, competição (MELO, 1998), indução de resistência (HOWEL, 2003), produção de hormônios de crescimento (HARMAN, 2000), mineralização da matéria orgânica do solo (ALTOMARE et al., 1999), retirada e translocação de minerais menos disponíveis com liberação de nutrientes do solo (KLEIFELD; CHET, 1992).

Martis-Córder e Melo (1998) estudaram a ação *in vitro* de isolados selvagens de *Trichoderma* spp. confrontados com *Verticillium dahliae*, causador de murcha em *Solanum melongena* (berinjela), e constataram que a produção de metabólitos inibiu o crescimento do patógeno, com destaque para o isolado de *Trichoderma* spp. - T15P que, com apenas quatro cm de diâmetro de colônia, foi capaz ao inibir completamente o crescimento do *V. dahliae*. De acordo com os autores, isso é explicado pela capacidade do antagonista em produzir metabólitos voláteis e não voláteis, que atuam interrompendo o crescimento micelial do patógeno.

Carvalho et al. (2011) testaram seis isolados de *Trichoderma harzianum* no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* em sementes de feijão, os quais apresentaram resultados promissores nos testes *in vitro* e, dentre os seis isolados, quatro apresentaram resultados superiores aos da testemunha nos testes *in vivo*, reduzindo de 31 a 51 % a incidência do patógeno e proporcionando entre 73 e 81% de plântulas normais, além de acréscimos no comprimento das mesmas. Para Howel (2003), o resultado pode estar associado com a capacidade naturalmente agressiva do *Trichoderma* em colonizar a rizosfera da planta e dificultar o desenvolvimento do patógeno, gerando, assim, condições mais favoráveis para o desenvolvimento da plântula, que são expressos em ganho em comprimento, massa seca e massa verde.

Em condições de campo, Mastouri et al. (2010) observaram resultados promissores após o tratamento de sementes de tomate com a cepa de *Trichoderma harzianum* (T22). Em um solo artificialmente infestado com *Phytium*, o percentual de plântulas tombadas em pós-emergência foi de até 15% para a testemunha, enquanto as sementes que receberam tratamento não apresentaram perdas de plântulas e tiveram um ganho de 46% em massa seca do sistema radicular. Esses ganhos, segundo Harman et al. (2004), podem estar diretamente ligados à capacidade de competição que *Trichoderma* tem com fungos fitopatogênicos deterioradores do sistema radicular, como é o caso de *Phytium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Sclerotinia*.

2.5.2 *Bacillus subtilis*

O gênero *Bacillus* é formado por bactérias em forma de bastonete, Gram positivas, móveis (LIMA, 2010) e que possuem estruturas de resistência, denominadas endospóros, que podem permanecer no solo por um longo período, mesmo em condições adversas. Bacon et al. (2001) consideram *Bacillus subtilis* um grupo de bactérias não patogênicas com alto potencial para uso industrial, por ser de fácil cultivo e multiplicação, além de formar endospóros que são uma vantagem para a maioria das aplicações industriais e usos biotecnológicos. Esses autores relatam, ainda, a redução nos níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium moniliforme* em função da ação biológica da *B. subtilis*.

O uso de um isolado de *B. subtilis* (CNPMS -22) inibiu o crescimento *in vitro* dos fungos *Fusarium moniliforme*, *Exserohilum turcicum*, *Acremonium strictum* e *Colletotrichum sublineolum*, causadores de danos em milho e sorgo (FIGUEIREDO et al., 2010). Em *Citrus*, a aplicação semanal de *B. subtilis*, reduziu em 47% a quantidade de flores com sintomas de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos (QPFC), assim como proporcionou um maior número médio de frutos efetivos (CORRÊA, 2010).

Em plantas de milho, Lima (2010) constatou que a inoculação das sementes com *B. subtilis* proporcionou aumento na produtividade de grãos, reduzindo os custos com adubação nitrogenada. Isso pode ser explicado pela capacidade que essa bactéria tem em produzir substâncias promotoras de crescimento e atuar na solubilização de fosfatos minerais (GAIND e GAUR 1991; SRINIVASAN et al., 1996; LUZ 2001), além de inibir o desenvolvimento de fitopatógenos associados ao rizoplano.

Pereira et al. (2008), por sua vez, identificaram oito espécies de rizobactérias em solo com plantio florestal, com destaque para *B. subtilis*, que foi encontrada em abundância em locais com plantio de *Eucalyptus*. Os autores evidenciam a necessidade de aprimorar e inovar nas técnicas de controle, com ênfase no controle biológico, já que essas rizobactérias estão disponíveis no habitat natural de ocorrência dos fitopatógenos, o solo.

Teixeira et al. (2005) destacam uma moderada redução no grau de infecção por ferrugem, quando fez-se a inoculação de *B. subtilis* no substrato das mudas, evidenciando uma indução de resistência até mesmo àqueles patógenos de parte aérea. Ainda na linha de inoculação da bactéria em substrato, Amorin e Melo (2002) observaram que *Bacillus subtilis* foi capaz de controlar *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*, além de promover maior

desenvolvimento tanto da raiz como da parte aérea de plântulas de citros quando comparados à testemunha sem inoculação daquela bactéria.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das sementes e local dos experimentos

As sementes de *Pinus elliottii* foram adquiridas na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro Florestas – Estação Experimental Boca do Monte, localizada no município de Santa Maria – RS e estavam armazenadas em câmara fria-seca, com temperatura entre 6 e 9 °C, e umidade relativa do ar entre 45 e 60%, desde 2009. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia e no Viveiro Florestal Juarez Martins Hoppe, ambos no Centro de Ciências Rurais na Universidade Federal de Santa Maria.

Os experimentos com avaliação de desenvolvimento de plântulas foram conduzidos em casa de vegetação, com irrigação diária realizada por uma barra móvel de microaspersores com lâmina d'água de 5 mm. Durante os períodos de dias chuvosos e temperaturas amenas, a irrigação era desligada, a fim de evitar o excesso de água nos locais. O clima da região caracteriza-se como subtropical úmido, do tipo “Cfa”, segundo a classificação de Köppen, com temperatura média do mês mais frio entre -3 e 18 °C, e do mês mais quente superior a 22 °C e precipitação média anual de 1.769 mm (MORENO, 1961).

3.2 Caracterização inicial da qualidade fisiológica e sanitária das sementes de *Pinus elliottii*

3.2.1 Teor de água

Para a determinação do teor de água das sementes de *Pinus elliottii*, foram utilizadas 100 sementes, divididas em quatro repetições de 25, as quais foram colocadas em estufa sob temperatura de 105 ± 3 °C, durante 24 horas. Os resultados foram expressos em percentagem com base no peso úmido das sementes, conforme as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.2 Germinação e Primeira Contagem de Germinação

Para o teste de germinação, foram usadas 200 sementes, divididas em quatro repetições de 50. As sementes foram desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 1 minuto, em seguida com uma solução de álcool a 70% (v/v) por 30 segundos e, após, lavadas em água destilada e esterilizada.

Baseando-se na metodologia adaptada de Brasil (2009), a semeadura foi realizada entre folhas de papel toalha e o umedecimento foi feito na proporção de 2,5 vezes o peso do papel com água destilada e esterilizada. O material foi acondicionado em câmara de incubação com temperatura controlada de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do vigor, através da primeira contagem de germinação, foi realizada aos sete dias, a contar da instalação do teste, e a germinação foi avaliada aos 14 dias. A primeira contagem foi somente de plântulas normais e, a segunda, de plântulas normais, anormais e sementes mortas, metodologia adaptada de BRASIL (2009).

3.2.3 Sanidade

Para o teste de sanidade, foram utilizadas 200 sementes não desinfestadas, divididas em quatro repetições de 50, distribuídas em caixas de plástico transparente (gerbox), previamente desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% e álcool a 70%, forradas com duas folhas de papel-filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada esterilizada. A incubação foi realizada em câmara com temperatura controlada a 22 ± 3 °C, e fotoperíodo de 12 horas, durante sete dias, quando ocorreu a avaliação e a identificação dos fungos, com o auxílio do microscópio estereoscópico e óptico, e bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

3.3 Teste de transmissão de fungos via semente

Para o teste de transmissão de fungos via sementes, foram utilizadas 100 sementes, divididas em quatro repetições de 25, colocadas em caixas “gerbox”, tendo como substrato areia peneirada (< 2 mm) esterilizada em autoclave por duas horas (com intervalo de 24 horas) a 1 atm e a 120 °C. Após 28 dias, as plântulas com sintomas e sementes mortas foram retiradas e colocadas imediatamente, sem desinfestação, em câmara úmida para que se fizesse a identificação dos patógenos associados ao material. A câmara úmida foi confeccionada com caixas plásticas (gerbox) desinfestadas (hipoclorito de sódio a 1% e álcool a 70%), contendo duas folhas de papel-filtro umedecido com água destilada esterilizada. As sementes e as plântulas permaneceram em câmara úmida, em ambiente de laboratório, por sete dias, quando foi realizada a identificação dos fungos.

Durante a identificação dos fungos, os que eram considerados potencialmente patogênicos no teste de transmissão, foram isolados em meio BDA suplementado com 4,0 mg de sulfato de estreptomicina (concentração de 70%)/100 mL de meio para a obtenção da cultura pura e posterior verificação da patogenicidade do mesmo.

3.4 Avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. associado a sementes de *Pinus elliottii* por meio de diferentes métodos de inoculação

3.4.1 Isolamento do fungo

Os fungos considerados potencialmente patogênicos, identificados no teste de sanidade e transmitidos via semente, foram isolados e mantidos em meio de cultura BDA e sulfato de estreptomicina para prevenir a contaminação por bactérias. Dentre os fungos potencialmente patogênicos identificados, apenas um isolado do fungo *Fusarium* sp. ocorreu em maior frequência, causando danos nas plântulas no teste de transmissão. Este isolado foi escolhido para a realização dos testes subsequentes.

Para que houvesse garantia da pureza do fungo isolado, foi feita a repicagem com apenas uma unidade formadora de colônia (UFC), onde um único esporo germinado foi

retirado de placas com meio de cultura ágar-água (AA) e transferido para meio BDA, obtendo-se, assim, uma cultura monospórica (FERNANDES, 1993).

3.4.2 Inoculação de *Fusarium* sp. nas sementes

Inicialmente, as sementes foram desinfestadas com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 1 minuto, em seguida com uma solução de álcool a 70% (v/v) por 30 segundos e, após, lavadas em água destilada e esterilizada e, em seguida, foram deixadas secar sob papel-filtro esterilizado. Para cada tratamento, foram utilizadas 100 sementes, divididas em quatro repetições de 25.

Após o período de incubação do fungo (sete dias sob temperatura de 22 ± 3 °C, com fotoperíodo de 12 horas), foi realizada a inoculação do mesmo nas sementes, através de três métodos: **a) contato com a cultura fúngica:** as sementes foram dispostas nas placas de Petri com o patógeno e mantidas por 48 horas, a uma temperatura de 22 ± 3 °C e fotoperíodo de 12 horas; **b) peliculização:** as sementes permaneceram por 15 minutos em contato com o polímero Polyssed CF[®], diluído numa proporção de 1:1 (1 ml de polímero: 1 ml de água). Com o auxílio de uma peneira, o excesso do produto foi retirado e as sementes permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas para melhor aderência do produto. Feito isso, as sementes peliculizadas foram mantidas submersas em uma suspensão de esporos de *Fusarium* sp. (10^6 esporos/ml) por 15 minutos. Na sequência, as mesmas sementes foram dispostas em folhas de papel-filtro esterilizado a temperatura ambiente, para secagem e posterior semeadura; e **c) peliculização + contato com a cultura fúngica:** as sementes passaram pelo processo de peliculização descrito no item **b**, e, em continuidade, foram mantidas em contato com a colônia fúngica, como descrito no item **a**. Os tratamentos considerados testemunha dividiram-se em peliculização (sementes tratadas apenas com o polímero); contato (sementes mantidas em meio BDA puro por 48 horas) e testemunha absoluta (sem tratamento algum), totalizando seis tratamentos (Quadro 1). Esses tratamentos foram testados para que fosse possível verificar se as metodologias utilizadas não estavam interferindo no processo germinativo das sementes e, com isso, mascarando os resultados.

Tratamentos	Composição dos tratamentos
T1	Contato + <i>Fusarium</i> sp.
T2	Peliculização + Contato + <i>Fusarium</i> sp.
T3	Peliculização + <i>Fusarium</i> sp.
T4	Peliculização
T5	Contato com meio BDA
T6	Sem tratamento

Quadro 1 - Organização dos tratamentos no teste de patogenicidade em sementes de *Pinus elliottii*.

Após os procedimentos de inoculação do patógeno, foram realizados os testes de sanidade (descrito no item 3.2.3) e emergência em areia. Para emergência em areia, as sementes foram colocadas em caixas “gerbox”, tendo como substrato areia peneirada (< 2 mm), esterilizada em autoclave por duas horas (com intervalo de 24 horas) a 1 atm e a 120 °C. O material permaneceu incubado em uma sala climatizada com temperatura de 25±2 °C e, com irrigação manual, sempre que necessário.

As variáveis avaliadas foram: **a) primeira contagem de emergência** (vigor): aos sete dias, foram contabilizadas aquelas plântulas que haviam emergido; **b) emergência de plântulas**: aos 28 dias, computando-se o número de plântulas emergidas, fez-se também a determinação do comprimento médio das plântulas normais, expresso em cm/plântula; **c) plântulas anormais sintomáticas**: foram verificados, diariamente, sintomas associados às estruturas essenciais¹ da plântula, causados pelo fungo *Fusarium* sp.; **d) sementes mortas**: aos 28 dias, contabilizou-se as sementes com aspecto apodrecido, que não haviam iniciado o processo germinativo. Para todas as variáveis os resultados foram expressos em porcentagem. Quando foi verificada a presença de tombamento, as mudas foram coletadas e incubadas em câmara úmida ou plaqueadas em meio de cultura BDA, a fim de verificar se os danos foram ocasionados pelo fungo inoculado. A incubação foi realizada em câmara com temperatura controlada de 22±3 °C, e fotoperíodo de 12 horas, e, decorridos cinco dias de incubação, o material foi analisado, com o objetivo de identificar os fungos presentes, com o auxílio do microscópio, estereoscópico e óptico, e bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

¹ Estruturas essenciais: sistema radicular (raiz primária e em certos gêneros raízes seminais), parte aérea (hipocótilo, epicótilo, mesocótilo (**Poaceae**), gemas terminais, cotilédones (um ou mais) e coleótilo em **Poaceae**) – Regra para Análise de Sementes, 2009.

3.4.3 Caracterização morfológica do isolado

3.4.3.1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM)

Discos de micélio e meio de cultura (12 mm), oriundos de culturas monospóricas do isolado, foram transferidos para o centro da placa de Petri, contendo meio BDA. As placas foram incubadas na temperatura de 25 °C e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 horas. O crescimento do micélio foi observado mediante a medição do diâmetro da colônia a cada 24 horas, com o auxílio do paquímetro digital. Sendo realizadas duas medidas em sentidos diametralmente opostos, Posteriormente, foi determinada a média de crescimento para cada placa (cm/dia). Esses dados foram utilizados para o cálculo do IVCM do fungo, empregando-se a fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991):

$$IVCM = \sum ((D - D_a) / N)$$

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial.

D = diâmetro médio atual da colônia.

D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior.

N = número de dias após a inoculação.

As leituras foram realizadas após 24 horas de instalação do experimento, até seis dias após a instalação, que correspondeu à colonização total da superfície do meio de cultura.

Para determinação do diâmetro da colônia (cm/dia), foram aproveitadas as mesmas medidas anteriores.

3.4.3.2 Cor da colônia

Uma alíquota de micélio do fungo foi transferida para tubos de ensaio contendo meio BDA e incubada por 10 dias, em temperatura de 25±2 °C e em regime de luz alternada com fotoperíodo de 12 horas. A determinação da cor foi visual com o auxílio de literatura específica (NELSON et al. 1983; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

3.4.3.3 Presença de estruturas reprodutivas

A partir da cultura monospórica, o isolado foi transferido para o meio de cultura Folha de Cravo-Ágar (FCA) que favorece a máxima expressão das características do fungo *Fusarium* sp.: forma e organização de macro e microconídios; tipo de conidióforos e presença e forma dos clamidósporos (NELSON et al., 1983; VENTURA, 1999).

Após dez dias de crescimento, foram confeccionadas lâminas utilizando glicerina a 15 % para visualização das estruturas reprodutivas com auxílio de microscópio óptico. Para determinação da dimensão das estruturas, foram realizadas medições de 20 conídios, comprimento e largura, com o auxílio de uma ocular OSM, acoplada ao microscópio de contraste Olympus BX41[®] na objetiva de 40x.

A identificação da espécie de *Fusarium* em questão foi realizada de acordo com a chave de classificação de Nelson et al. (1983) e descrições feitas por Gerlach e Nirenberg (1982). A chave usada divide as espécies de *Fusarium* em seções, de acordo com as similaridades morfológicas das espécies. As sessões são as seguintes: *Eufionnotes*, *Spicarioides*, *Arachnites*, *Sporotrichiella*, *Roseum*, *Arthrosporiella*, *Gibbosum*, *Discolor*, *Lateritium*, *Liseola*, *Elegans* e *Martiella-Ventricosum*. Inicialmente, foi definida em qual seção a espécie poderia estar inserida, a partir de características fenotípicas, e, na sequência, dentro do grupo definido, procedeu-se à identificação da espécie.

3.4.4 Caracterização molecular do isolado patogênico

Com as amostras já identificadas, fez-se a extração do DNA do patógeno, conforme método CTBA descrito por Doyle e Doyle (1991). As amostras de DNA genômico extraídas foram submetidas à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para a amplificação das regiões: ITS do rDNA com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TTCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (WHITE et al., 1990); fator de elongação alfa, com o par de primers EF1-T (ATGGGTAAGGARGACAAGAC) e EF1-1567R (ACHGTRCCRATACCACCRATCTT) (REHNER; BUCKLEY, 2005); beta-tubulina, amplificado com o par de primers Btub-F

(AAGGGHCAYTAYACYGARGG) e Btub-R (CATGTTGGACTCDGCCTC)
(Desenvolvido no Instituto Biológico – São Paulo - SP).

A reação contém aproximadamente 30 ng de DNA, tampão 10X, 2,5 µM de cada dNTP, 20 nM de MgCl₂, 25 pmoles de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, cinco unidades da enzima Taq polimerase e água ultrapura para completar o volume da reação. As reações foram realizadas em termociclador MJ Research, INC. PTC – 100MT, sob as seguintes condições térmicas: 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 35 s e 72 °C por 10 min. Ao final da reação, os produtos da PCR foram mantidos a 4 °C. Um controle negativo sem DNA foi incluído nas amplificações do PCR. Os fragmentos amplificados e o controle foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, em tampão TBE 1X (10,8 g de tris base, 5,5 g de ácido bórico, 4 ml de EDTA a 0,5 M e 4 ml de água destilada), contendo brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta.

Os produtos da PCR foram purificados com PEG 8000 a 13% e, nas reações de sequenciamento para os oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, as sequências geradas continham de 400 a 900 pb, tamanho referente ao segmento que corresponde às regiões ITS1, 5.8S e ITS2. Para a região de codificação do fator de alongação alfa e da beta-tubulina, foram utilizados fragmentos de 1100 pb e 900 pb, respectivamente.

O sequenciamento foi efetivado em sequenciador Mega BACE 500 (Amersham). Os fragmentos sequenciados foram analisados utilizando-se o programa BioEdit (HALL, 1999). As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as já existentes no *GenBank* para o patógeno isolado. As sequências do *GenBank* que apresentaram os maiores “escores” foram selecionadas e alinhadas juntamente com as sequências obtidas no sequenciamento pelo algoritmo ClustalW, além disso, a análise filogenética foi conduzida adotando-se o método “*Neighbour-joining*” com 1000 replicatas pelo programa MEGA versão 4 (TAMURA et al, 2007). A similaridade das sequências de nucleotídeos entre os isolados foi calculada através do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Após, as sequência-consenso obtidas deverão ser inseridas no *GenBank*, sediado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1997), onde receberá os códigos de acesso para consultas futuras.

3.5 Microbiolização em sementes de *Pinus elliottii*

3.5.1 Produtos utilizados

Foram testados dois produtos comerciais: Agrotlich Plus[®] e Rizolyptus[®] à base do fungo *Trichoderma* spp. e da bactéria *Bacillus subtilis*, respectivamente. Os referidos produtos permaneceram armazenados em geladeira até a sua utilização.

Os produtos foram transferidos em pequenas quantidades para placas de Petri com meio de cultura BDA, onde os microrganismos cresceram por sete dias e 48 horas, respectivamente, para o Agrotlich Plus[®] e Rizolyptus[®], antes de serem utilizados.

3.5.2 Inoculação dos bioprotetores

Em um primeiro momento, as sementes passaram por uma assepsia superficial com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 1 minuto, em seguida com uma solução de álcool a 70% (v/v) por 30 segundos e, após lavadas em água destilada esterilizada e deixadas secar sob papel-filtro esterilizado. Para cada tratamento, foram utilizadas 100 sementes, divididas em quatro repetições de 25.

Após os períodos de incubação do fungo e da bactéria (sete e dois dias, respectivamente), sob temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 12 horas, procedeu-se à inoculação dos mesmos nas sementes, através de quatro métodos: **a) contato via BDA:** as sementes foram dispostas nas placas de Petri com o antagonista e mantidas por 48 horas, a uma temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas; **b) peliculização:** as sementes permaneceram por 15 minutos em contato com o polímero Polyssed[®], diluído numa proporção de 1:1 (1 ml de polímero: 1 ml de água). Com o auxílio de uma peneira, o excesso do produto foi retirado e as sementes permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas para melhor aderência do produto. Posteriormente, as sementes peliculizadas foram mantidas por 15 minutos em contato com uma suspensão, obtida pela adição de 1 ml de água esterilizada nos produtos comerciais Agrotlich Plus[®] (0,10g p. c.) e Rizolyptus[®] (0,10 ml p. c.). Essa concentração foi utilizada para cada 100 sementes. Na sequência, elas foram

dispostas em folhas de papel-filtro esterilizado a temperatura ambiente, para secagem e posterior semeadura; **c) peliculização + contato via BDA:** as sementes permaneceram por 15 minutos em contato com o polímero Polyssed[®], diluído numa proporção de 1:1 (1 ml de polímero: 1 ml de água). Com o auxílio de uma peneira, o excesso do produto foi retirado e as sementes permaneceram em temperatura ambiente por 24 horas para melhor aderência do produto. Posteriormente, foram transferidas para placas de Petri crescidas com o antagonista, onde permaneceram incubadas por 48 horas a uma temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas; e **d) inoculação direta:** as sementes foram mantidas por 15 minutos em contato com uma suspensão, obtida pela adição de 1 ml de água esterilizada nos produtos comerciais Agrotich Plus[®] (0,10g p. c.) e Rizolyptus[®] (0,10 ml p. c.). Essa concentração foi empregada para cada 100 sementes. Na sequência, elas foram dispostas em folhas de papel-filtro esterilizado a temperatura ambiente, para secagem e posterior semeadura.

Depois da aplicação dos tratamentos, as sementes passaram por testes de germinação, sanidade (descritos nos itens 3.2.2 e 3.2.3, respectivamente) e emergência em substrato no viveiro.

Para o teste de emergência no viveiro, a semeadura foi realizada em bandejas de isopor (uma semente/célula), e o substrato utilizado foi Carolina Soil[®]. O material permaneceu em condições de casa de vegetação citadas no item 3.1. As variáveis avaliadas foram: **a) emergência de plântulas:** aos 28 dias, computando-se o número de plântulas emergidas; **b) sementes não germinadas:** sementes mortas e/ou duras que não deram início ao processo germinativo. Os resultados das variáveis dos itens **a** e **b** foram expressos em percentagem; **c) comprimento da plântula:** foram medidas 10 plântulas por repetição, com o auxílio de régua graduada; após, fez-se a média e os resultados foram expressos em cm/plântula; **d) massa verde de plântulas:** todas as plântulas de cada repetição foram pesadas em balança analítica de precisão 0,01 g. Procedeu-se à média por repetição e os resultados foram expressos em g/plântula; **e) massa seca de plântulas:** para a determinação da massa seca, as plântulas usadas na determinação da massa verde foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60 ± 2 °C, por 24 horas, para posterior pesagem. Os resultados foram expressos em g/plântula.

Os tratamentos testemunha dividiram-se em peliculização (sementes tratadas apenas com o polímero); contato (sementes mantidas em meio BDA puro por 48 horas) e testemunha absoluta (sem tratamento), totalizando 11 tratamentos (Quadro 2).

Tratamento	Forma de inoculação	X	Agente biológico
T1	Contato	X	Agrotrich Plus®
T2	Contato	X	Rizolyptus®
T3	Peliculização + Contato	X	Agrotrich Plus®
T4	Peliculização + Contato	X	Rizolyptus®
T5	Peliculização	X	Agrotrich Plus®
T6	Peliculização	X	Rizolyptus®
T7	Direta	X	Rizolyptus®
T8	Direta	X	Agrotrich Plus®
T9	Peliculização	X	-
T10	Contato	X	-
T11	Sem tratamento	X	-

Quadro 2 - Organização dos tratamentos no teste de microbiolização de sementes de *Pinus elliottii*.

3.6 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotrich Plus® e Rizolyptus® *in vitro* sobre *Fusarium sambucinum*

A ação antagonista do fungo *Trichoderma* spp. (forma comercial Agrotrich Plus®) e da bactéria *Bacillus subtilis* (forma comercial Rizolyptus®) sobre o fungo patogênico *Fusarium sambucinum* foi avaliada através do teste de confrontação direta. Para cada confronto, efetuaram-se quatro repetições, onde cada repetição foi constituída por uma placa de Petri.

Trichoderma* spp. x *Fusarium sambucinum (Figura 1A): um cilindro de meio de cultura BDA de 8 mm de diâmetro contendo micélio de *F. sambucinum*, crescido por 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 horas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. 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 *Fusarium* sp. nas placas de Petri. As placas foram incubadas durante sete dias a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 horas. As placas controle foram compostas apenas por *Trichoderma* spp. e apenas por *F. sambucinum*. Foram feitas medidas do crescimento de ambas as colônias, diariamente, até completar o diâmetro da placa.

Bacillus subtilis* x *Fusarium sambucinum (Figura 1B): um cilindro de meio de cultura BDA de 8 mm de diâmetro contendo micélio de *F. sambucinum* foi transferido para o centro da placa de Petri (90 mm de diâmetro), também contendo meio BDA. Esse material foi

incubado durante 48 horas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, quatro gotas de 0,5 ml contendo células bacterianas de *B. subtilis* foram dispostas equidistantes entre si e do centro da placa de Petri. As placas foram mantidas em incubadora, nas mesmas condições, avaliando-se a ocorrência de antagonismo a cada 24 horas, comparando com as placas controle (apenas *B. subtilis* e apenas *F. sambucinum*) (SOTTERO et al., 2006).

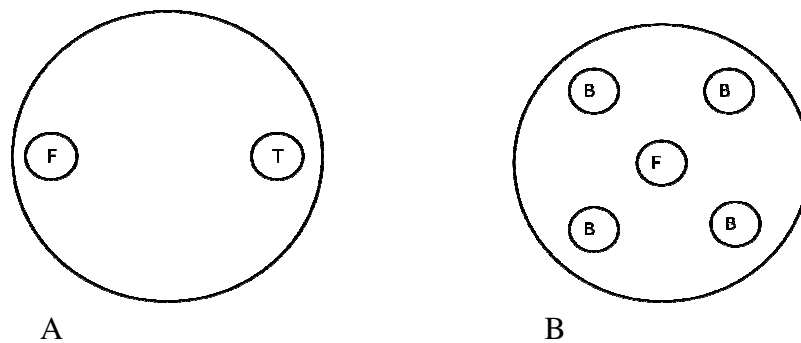


Figura 1 - Organização do teste de confronto direto. A: *Fusarium sambucinum* (F) x *Trichoderma* spp. (T). B: *Fusarium sambucinum* (F) x *Bacillus subtilis* (B).

3.7 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotlich Plus[®] e Rizolyptus[®] *in vivo* sobre *Fusarium sambucinum*

A partir dos resultados obtidos nos testes dos itens 3.3, 3.4 e 3.5, fez-se a seleção dos melhores métodos de inoculação de *Fusarium sambucinum* e dos agentes biocontroladores, para aplicar em situação de viveiro. Os tratamentos desenvolvidos, neste estudo, estão apresentados no Quadro 3.

Tratamentos	Método de inoculação do patógeno	X	Método de inoculação dos biocontroladores
T1	Contato + <i>F. sambucinum</i>	X	-
T2	Contato + <i>F. sambucinum</i>	X	Contato + Rizolyptus [®]
T3	Contato + <i>F. sambucinum</i>	X	Direta Rizolyptus [®]
T4	Contato + <i>F. sambucinum</i>	X	Direta Agrotich Plus [®]
T5	Peliculização + <i>F. sambucinum</i>	X	-
T6	Peliculização + <i>F. sambucinum</i>	X	Contato + Rizolyptus [®]
T7	Peliculização + <i>F. sambucinum</i>	X	Direta Rizolyptus [®]
T8	Peliculização + <i>F. sambucinum</i>	X	Direta Agrotich Plus [®]
Sem tratamento	-	X	-

Quadro 3 - Organização dos tratamentos do teste de biocontrole dos produtos Agrotich Plus[®] e Rizolyptus[®] in vivo sobre *Fusarium. sambucinum*.

Inicialmente, as sementes passaram por uma assepsia superficial com uma solução de hipoclorito de sódio a 1% (v/v) por 1 minuto, em seguida com uma solução de álcool a 70% (v/v) por 30 segundos e, na sequência, lavadas em água destilada, esterilizada e deixadas secar, postas sob papel-filtro esterilizado.

As metodologias de inoculação realizadas foram as mesmas descritas nos itens 3.3 e 3.4, porém, combinando os métodos de inoculação do patógeno com os métodos de inoculação dos agentes biocontroladores (Quadro 3).

Foram utilizadas 100 sementes para cada tratamento, divididas em quatro repetições de 25, colocadas em tubetes de 50 cm³ com o substrato Carolina Soil[®] esterilizado. As avaliações foram: **a) sintomas de *F. sambucinum***: semanais (até os 42 dias), na última avaliação, as plântulas tombadas foram quantificadas; **b) sementes não germinadas**: compreendem as sementes mortas e/ou duras que não deram início ao processo germinativo; **c) emergência**: semanais (até os 42 dias), computando-se o número de plântulas emergidas. Para os itens **a**, **b** e **c**, os resultados foram expressos em percentagem. Na última contagem de emergência (42 dias), realizou-se as seguintes avaliações: **d) comprimento da parte aérea, radicular e comprimento total**: mediu-se 10 plântulas por repetição. Elas foram medidas com auxílio de régua graduada e os resultados foram expressos em cm/plântula; **e) massa verde de plântulas**: todas as plântulas de cada repetição foram pesadas em balança analítica de precisão 0,01g. Os resultados foram expressos em g/plântula; **f) 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, por 24 horas, para posterior pesagem. Os resultados foram expressos em g/plântula.

3.7.1 População de fungos no substrato

Foram feitas diluições seriais para a comprovação de que *Fusarium sambucinum* e *Trichoderma* spp., inoculados, estavam realmente presentes no substrato. Para isso, foram usados 5g de solo de cada tratamento, diluídos em 95 mL de água destilada e esterilizada, acrescida de duas gotas do emulsificante Tween 80[®]. A suspensão foi agitada por 10 minutos, manualmente e, dessa suspensão, foram feitas diluições seriais até 10⁻⁴. De cada diluição, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL e colocada em quatro placas de Petri contendo meio BDA acrescido com 0,05 mg de estreptomicina/100 mL de meio (MILANESI, 2009).

Após a incubação por quatro dias (25±2°C, fotoperíodo de 12 horas), as colônias de *F. sambucinum* e *Trichoderma* spp. foram quantificadas, quanto à ausência (-) e à presença (+), na diluição 10⁻³, e classificadas em nível de gênero, através de observações das placas em microscópio, estereoscópico e confecção de lâminas para observação em microscópio ótico, com base na bibliografia especializada (BARNETT; HUNTER, 1999).

No caso dos tratamentos com *B. subtilis*, não foram realizadas diluições seriais, pois não havia condições técnicas para fazer a identificação precisa da bactéria em nível de espécie.

3.8 Procedimentos estatísticos

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 arc sen $\sqrt{x}/100$. Os resultados em unidades decimais, não sofreram transformações.

A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e, em alguns casos, fez-se uma comparação de grupos de médias por contrastes ortogonais, com a finalidade de testar o efeito dos métodos de inoculação e dos agentes biológicos de uma maneira geral, complementando o teste de médias. Para as variáveis, diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial, foi realizada uma análise de regressão em função do tempo em horas. O *software* utilizado foi SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização inicial das sementes

Na caracterização inicial das sementes de *Pinus elliottii*, o teor de água foi de 10,23% e a germinação de 80%. Na análise sanitária, verificou-se a presença dos seguintes fungos: *Aspergillus* spp. (23%), *Fusarium* sp. (3%), *Penicillium* spp. (26%) e *Trichoderma* spp. (12%). Esses dados não foram analisados estatisticamente, pois serviram apenas como base para o conhecimento inicial da qualidade do lote adquirido. De acordo com o teor de água e o percentual de germinação, foi possível constatar que as sementes de *P. elliottii* apresentavam qualidade para os testes subsequentes.

4.2 Teste de transmissão de fungos via semente

As variáveis analisadas e os seus respectivos resultados no teste de transmissão foram: plântulas normais (72%), plântulas sintomáticas (5%), plântulas anormais (11%) e sementes mortas (17%).

Os sintomas constatados foram apodrecimento da parte aérea, não ocorrendo desprendimento do tegumento e anelamento no colo da plântula. O patógeno identificado associado a esses sintomas foi *Fusarium* sp., enquanto, nas sementes mortas, houve predomínio do gênero *Penicillium*. Lazarotto (2010) também notou maior incidência de *Penicillium* sp. em sementes não germinadas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), além da transmissão de *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp. via semente, causando podridão nos cotilédones e no sistema radicular das plântulas.

Além do estudo referido, outros estudos comprovam a transmissão de *Fusarium* sp. de sementes para a plântula, tanto em espécies florestais como agrícolas. Benetti et al. (2009) confirmaram a transmissão de *Fusarium* sp. em sementes de cedro, causando redução na emergência. Santos et al. (2011) relataram que, dos fungos identificados associados a sementes de pupunha (*Euterpe edulis* Mart.), apenas *Fusarium* sp. foi transmitido para plântulas. Já Mendes et al. (2005) constataram a presença de *Fusarium solani* em 27,5% das

sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.) que não germinaram e Balardin et al. (2005) verificaram a transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão-vermelha da raiz de soja (*Glycine Max* Merr.). Garcia Júnior (2006) constatou a transmissão de *Fusarium graminearum*, via sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.), para diferentes partes da plântula (raiz, colo e haste).

4.3 Avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. associado a sementes de *Pinus elliottii* através de diferentes métodos de inoculação

Na Tabela 1, encontram-se os resultados de emergência de sementes de *Pinus elliottii*, após inoculação do fungo *Fusarium* sp. por diferentes métodos. Verifica-se que o percentual de emergência das sementes inoculadas (T1, T2 e T3) diferiu estatisticamente da testemunha em todos os tratamentos, exceto contato em meio BDA, sendo inferior numericamente quando as sementes foram inoculadas via peliculização. Essa técnica é comumente utilizada por permitir, dentre outros usos, a adição de insumos agrícolas, organismos de biocontrole e micronutrientes às sementes (DINIZ et al., 2006).

A peliculização atua como um adesivo que, por um lado, pode facilitar a retenção do patógeno e, por outro, pode retardar o processo germinativo da semente. No presente trabalho, foi possível verificar que a inoculação das sementes com o fungo, associado ao polímero, aumentou o efeito nocivo de *Fusarium* sp. sobre a germinação e o desenvolvimento das plântulas de *P. elliottii*, já que o percentual de plântulas anormais sintomáticas alcançou 27,5, quando a inoculação do patógeno foi feita via peliculização (Tabela 1). No entanto, o percentual de emergência das sementes tratadas apenas com o polímero foi relativamente baixo (48%), diferindo estatisticamente da testemunha - sem tratamento (71,5%). Dessa maneira, tem-se que o método torna-se ineficaz, visto que interfere no processo germinativo.

A inoculação via contato fúngico (T1) proporcionou um valor de plântulas anormais sintomáticas de 25% e o menor valor de comprimento de plântula (6,1 cm), mostrando-se eficiente na inoculação do patógeno. Esse método foi adotado com sucesso por Rego (2008) para inoculação de *Colletotrichum* sp., *Curvularia* sp., *Cladosporium* sp., *Pestalotia* sp. e *Macrophomina* sp. em sementes de murta (*Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O.Berg), e Lazarotto et al. (2010) para inoculação de *Rhizoctonia* sp. em sementes de cedro (*Cedrela fissilis*).

De acordo com Lazarotto (2010), a realização do teste de patogenicidade dos fungos identificados associados às sementes no teste de sanidade e transmissão é uma maneira de confirmar ou excluir a hipótese de que esses microrganismos são realmente patogênicos a espécie florestal em estudo. Os resultados expressos na Tabela 1 indicam que o isolado de *Fusarium* sp. é patogênico a *Pinus elliottii*, já que todos os tratamentos, onde o patógeno foi inoculado, apresentaram percentuais de emergência estatisticamente inferiores à testemunha (sem tratamento).

Tabela 1 - Valores médios de primeira contagem de emergência (PCE), emergência (E28), plântulas anormais sintomáticas (PAS), sementes mortas (SM) e comprimento de plântula (CP) de sementes de *Pinus elliottii*, após diferentes formas de inoculação de *Fusarium* sp.

Tratamentos	Variáveis				
	PCE (%)	E28 (%)	PAS (%)	SM (%)	CP cm/plântula
T1 - Contato + <i>Fusarium</i> sp.	15 b*	36 c	25 a	39 ab	6,1 c
T2 - Peliculização + Contato + <i>Fusarium</i> sp.	5,0b	43,5c	15 ab	41,5ab	6,78c
T3 - Peliculização + <i>Fusarium</i> sp.	8,0b	26c	27,5a	46,5a	7,81bc
T4 - Peliculização	16b	48bc	19ab	33ab	9,42ab
T5 - Contato com meio BDA	43,5a	68ab	16ab	16b	10,27a
T6 - Sem tratamento	2,0b	71,5a	5,0b	23,5ab	7,41bc
C.V.(%)	22,1	21,27	23,45	18,31	11,68

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância. C.V.(%) = coeficiente de variação.

A fusariose, em diferentes gêneros de *Pinus*, é relatada como uma doença importante, na fase de viveiro, causando descoloração nas acículas, secamento na parte apical, escurecimento e estagnação do crescimento radicular (GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER, 2006). No presente trabalho, os sintomas verificados nas plântulas foram apodrecimento dos cotilédones sem o desprendimento completo do tegumento (Figura 2-A); murcha da plântula sem o desenvolvimento inicial da parte aérea e tecido com aspecto apodrecido (Figura 2-B), além de lesão seguida de ruptura do hipocótilo (Figura 2-C).

Milanesi (2009) relatou que a espécie *Fusarium avenaceum* isolada de plantas com PVR (podridão-vermelha-da-raiz) prejudicou o processo de frutificação (cultivar

FUNDACEP 59 RR), quando plantas de soja foram inoculadas. Segundo o autor, durante a infecção e a colonização do patógeno nos tecidos da planta, ocorrem muitas reações em cadeia que terão interferências diretas em alguns metabolismos e, entre eles, o hormonal.

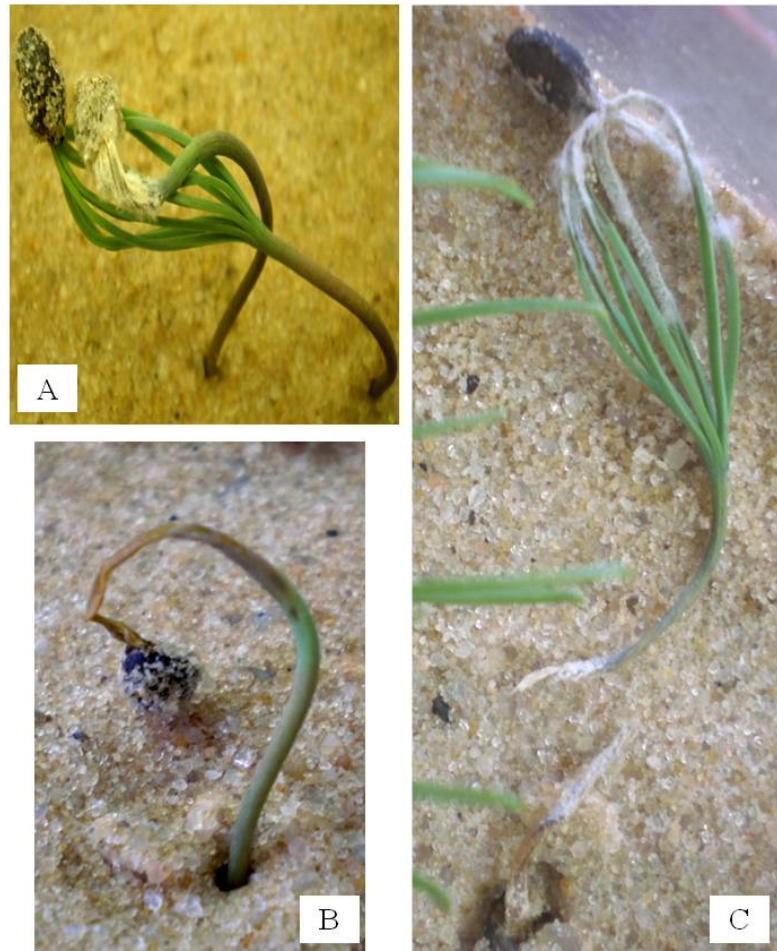


Figura 2 - Sintomas observados em plântulas no teste de patogenicidade. Apodrecimento dos cotilédones sem o desprendimento completo do tegumento (A); murcha da plântula sem o desenvolvimento inicial da parte aérea, tecido com aspecto apodrecido (B) lesão e posterior ruptura do hipocótilo (C).

Na Tabela 2, encontram-se os fungos identificados nas sementes de *P. elliottii* após a inoculação de *Fusarium* sp. Os resultados são coerentes com o esperado, já que o percentual de *Fusarium* sp., nas sementes inoculadas, variou de 87 a 100%. No tratamento testemunha (T6), foram identificados, ainda, os gêneros *Alternaria* (7%) e *Aspergillus* (19%). Não foi verificada a presença de *Fusarium* sp. nos tratamentos testemunhas com o polímero (T4) e contato em BDA (T5) (Tabela 2), porém plântulas sintomáticas foram contabilizadas em

ambos os tratamentos (Tabela 1), isso se deve, provavelmente, ao fungo já estar nas estruturas internas da semente, associado ao embrião. De acordo com Sá et al. (2011), os fungos são os mais ativos entre os agentes patogênicos, tendo uma maior habilidade em penetrar e estabelecer-se internamente nos tecidos vegetais.

Nos tratamentos em que houve ocorrência de *Fusarium* sp., a presença de *Penicillium* sp. foi suprimida e o mesmo ocorreu para a situação contrária (Tabela 2), sugerindo uma situação de competição entre os dois fungos pelo substrato nutricional. Ambos os gêneros, segundo Farias et al. (2000), são potenciais produtores de micotoxinas, responsáveis por inúmeras implicações para a espécie humana e vegetal. Ethur et al. (2007), estudando a ação antagonista dos gêneros *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. sobre *Fusarium oxysporum*, concluíram que *Penicillium* sp. mostrou maior eficiência no controle do patógeno.

O fato de o polímero ser diluído em água antes da aplicação pode formar um ambiente propício para proliferação de fungos de armazenamento na semente, como é o caso do gênero *Penicillium*, que foi verificado em 76 % das sementes do tratamento apenas com peliculização (T4). Para Vechiato (2010), os teores de umidade em torno de 25 % favorecem a proliferação dos fungos *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., potenciais deterioradores de sementes.

Tabela 2 - Incidência média (%) de fungos em sementes de *Pinus elliottii* após diferentes formas de inoculação de *Fusarium* sp.

Tratamentos	Fungos (%)	
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
T1 - Contato + <i>Fusarium</i> sp.	95 a*	1,0b
T2 - Peliculização + Contato + <i>Fusarium</i> sp.	51 b	2,0b
T3 - Peliculização + <i>Fusarium</i> sp.	95,5 a	1,0b
T4 - Peliculização	0,0c	76 a
T5 - Contato com meio BDA	0,0c	20 a
T6 - Sem tratamento	10c	55 a
C.V. (%)	26,58	28,45

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

C.V. (%) = coeficiente de variação.

4.4 Caracterização do isolado *Fusarium* sp.

4.4.1 Caracterização morfológica

O isolado de *Fusarium* foi alocado na seção Discolor, que compreende as espécies: *F. heterosporum*, *F. reticulatum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* e *F. crookwellense*. Com base nas características contempladas na chave de classificação morfológica, a espécie foi identificada como *F. sambucinum* (NELSON et al., 1983).

Os resultados referentes às características morfológicas estão apresentados na Tabela 3. Os macroconídios formados em esporodóquio laranja pálido puderam ser observados em meio FCA, sendo relativamente curtos e delgados (40,2 x 4,7 μ c) e com uma média de cinco septos. Com formato pontiagudo na célula apical e pedicelado na célula basal, concordando com as descrições de Leslie e Summerell (2006). Não foi identificada a presença de microconídios, segundo os autores, esta espécie raramente forma microconídios e, em determinados isolados, não se verifica a formação.

A pigmentação da cultura em meio BDA apresentou um tom bronzeado, com micélio aéreo esbranquiçado. A superfície inferior da cultura apresentava pontos com coloração escura, variando em tom bronzeado e marrom escuro. A colônia apresentou um crescimento de 5,5 cm de diâmetro micelial, após 72 horas de incubação a 25 \pm 2 °C e fotoperíodo de 12 horas (Figura 3). Poletto et al. (2005), caracterizando morfológicamente um isolado de *Fusarium avenaceum* obtido de raízes de erva-mate com podridão, verificaram um crescimento micelial médio de 5,0 cm em 72 horas de incubação. Gupta et al. (2010), por sua vez, relataram que *Fusarium oxysporum* f. sp. *psidii* e *Fusarium solani* apresentaram um crescimento máximo de 7,25 cm em uma temperatura de 28 °C, após sete dias de incubação.

Constatou-se a presença de clamidósporos, ocorrendo isolados e/ou em pares. A presença ou a ausência de clamidósporo é uma característica que aproxima as espécies em determinada seção. Angelotti et al. (2006), caracterizando morfológicamente *F. graminearum*, pertencente a mesma seção da espécie em estudo, também verificaram a presença de clamidósporos em 50% dos isolados analisados. No caso das espécies pertencentes à seção Liseola (complexo *Giberela fujikuroi*), não há desenvolvimento de clamidósporos (NELSON et al., 1983).

Tabela 3 - Características morfológicas de *Fusarium sambucinum* isolado a partir de sementes de *Pinus elliottii*.

Características morfológicas do isolado		
Pigmentação da cultura ¹	Bronzeado	Fig. 3A
Tamanho de macroconídio ²	40,2 x 4,7 µc	Fig. 3B e 3D
Número médio de septos ²	5 (cinco)	-
Esporodóquio ²	Presente, de cor laranja pálido.	Fig. 3C
Microconídios ²	Ausentes	-
Clamidósporo ²	Presente, ocorrendo isolado ou em pares.	Fig.3E
Conidióforo ²	Presente, em monofiálide.	Fig.3F

¹ Meio de cultura batata-dextrose-ágar, 25±2 °C e fotoperíodo de 12 horas; ² Meio de cultura folha de cravo-ágar, 25±2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

A Figura 3D apresenta os macroconídios do fungo, com diferentes formas e tamanhos, alguns que podem ser confundidos com microconídios, porém, segundo Gerlach e Nirenberg (1982), essa variação pode estar associada à cepa do fungo e ao tipo de substrato que está inserido.

A fase sexuada de *Fusarium sambucinum* corresponde a *Gibberella pulicaris* que, conforme Beremand et al. (1991), é um patógeno prejudicial, causando câncros em espécies arbóreas e podridão radicular em plântulas de cereais. Produz *trichotheceno*, uma micotoxina que atua na inibição da síntese proteica dos vegetais e causa sérios problemas em animais e humanos (MARASAS et al., 1984). Existem relatos deste fungo associado à podridão-seca em tubérculos de batata (TUMBALAM; KIRK, 2006; LI et al., 2007; SUN et al., 2008). Acrescente-se que esse é o primeiro relato de *Fusarium sambucinum* associado a sementes de *P. elliottii*, bem como a patogenicidade deste fungo em plântulas dessa espécie. Ocamb et al. (2002) relataram *F. sambucinum* associado a dois lotes de sementes de *Pinus strobus* L., além de *F. acuminatum*, *F. chlamydosporum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. polyphialidicum*, *F. heterosporum*, *F. semitectum*, *F. proliferatum*, *F. sporotrichioides*. As duas últimas espécies foram testadas quanto a sua patogenicidade em mudas de *Pinus strobus*, apresentando sintomas semelhantes ao do presente trabalho: apodrecimento e redução no desenvolvimento do sistema radicular.

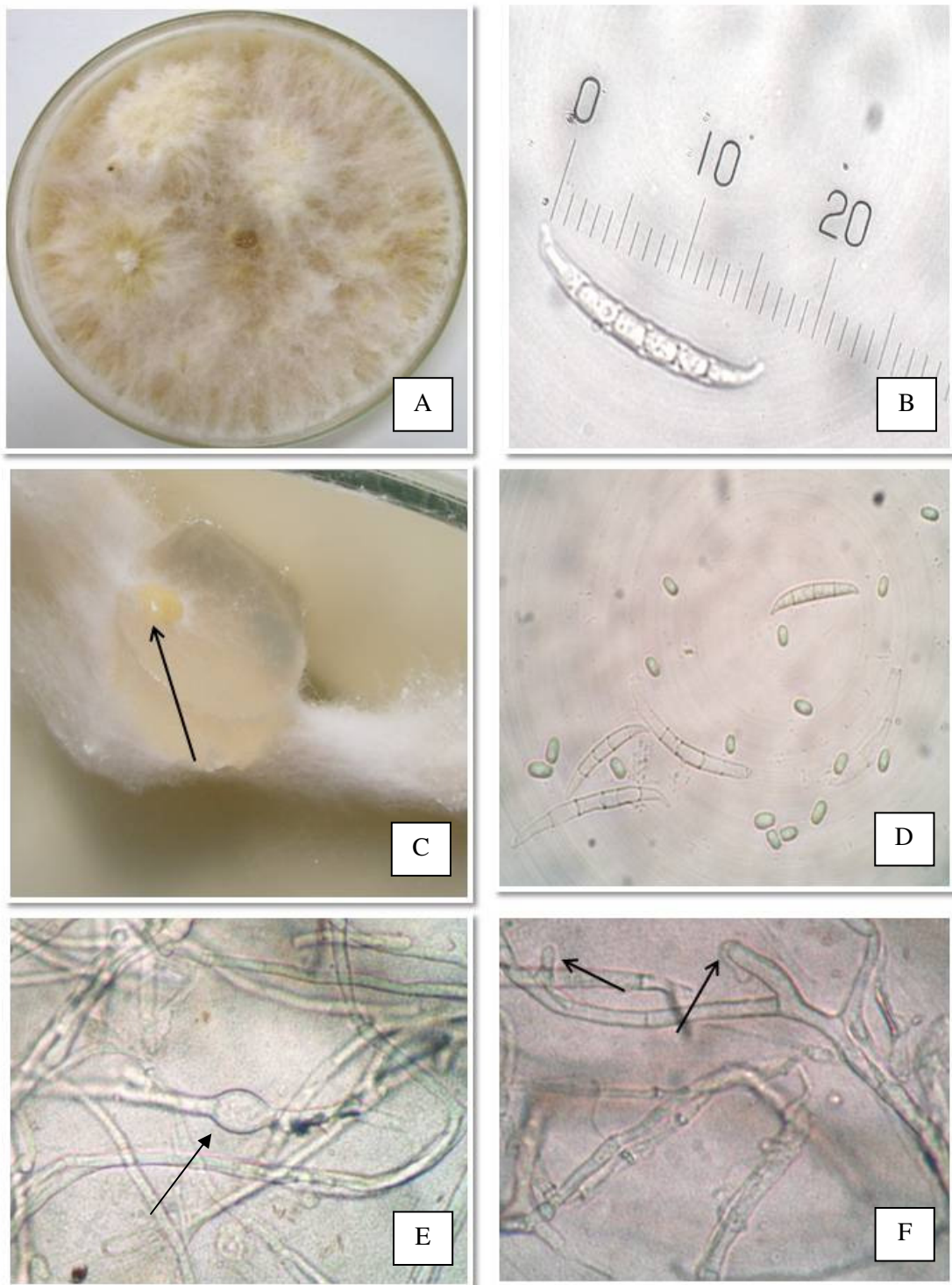


Figura 3 - Características morfológicas de *Fusarium sambucinum*. Cultura em meio BDA (A); medida microscópica de macroconídio (B); esporodóquio em meio FCA (C); macroconídios (D); estruturas de resistência (clamidósporos) (E) e conidióforo em monofialide (F).

O fungo *Fusarium sambucinum* apresentou uma relação linear entre o diâmetro da colônia e o tempo de 144 horas de avaliação (Figura 4), indicando que, enquanto o fungo encontrar substrato e espaço disponível, continuará se multiplicando. O crescimento da colônia foi de aproximadamente 2,0cm a cada 24 horas, sendo mais lento a partir das 96 horas. O índice de velocidade de crescimento micelial máximo de 0,97cm foi alcançado 72 horas após a incubação, para esta variável, houve uma relação quadrática com o tempo.

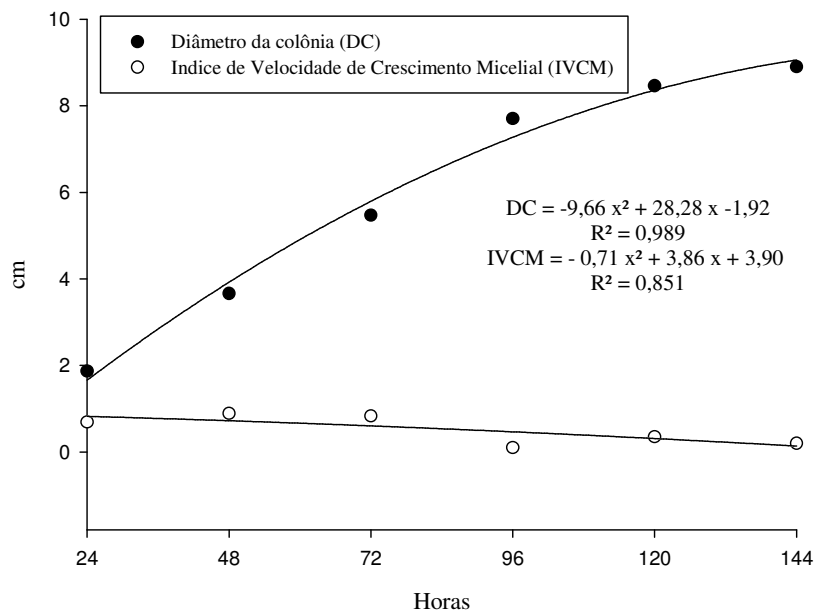


Figura 4 – Análise de regressão para diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial de *Fusarium sambucinum* em meio BDA, incubado a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas.

4.4.2 Caracterização molecular

Foram gerados dendrogramas filogenéticos para cada região genômica: ITS (Figura 5), fator alongação 1- α (Figura 6) e beta – tubulina (Figura 7).

Nas Tabelas 4, 5 e 6, são apresentados os acessos utilizados para a comparação filogenética, obtidas a partir do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), seguidas de seu número de acesso, percentual de cobertura e similaridade. Para a construção dos dendrogramas, foram escolhidos acessos com maior similaridade e cobertura da sequência, obtidos após o alinhamento.

Com o sequenciamento da região ITS (ITS1, 5.8S e ITS2), não foi possível definir, de forma conclusiva, a espécie em questão, pois, embora o isolado de *Fusarium* sp. do presente estudo tenha ficado agrupado no mesmo *clade* (ramo) que a espécie *Fusarium sambucinum* (X65482; X65481) e, apresentado uma alta similaridade (97 e 96%), o suporte de *bootstrap* foi de 44%, considerado baixo. De acordo com Schroers et al. (2009), somente valores de *bootstrap* superiores a 90% são considerados altos e relevantes para determinação da espécie.

A codificação da região ITS não tem sido eficaz para a determinação de algumas espécies de *Fusarium* sp. devido a presença de duas cópias não homólogas dentro da região ITS2, causando divergência nos resultados (WAALWIJK et al., 1996). O'Donnell et al. (1998) também não obtiveram êxito para alguns isolados de *Fusarium* sp., pertencentes ao complexo *Gibberella fujikuroi* com a região ITS, no entanto, a região da beta-tubulina foi eficiente para a diferenciação das espécies.

A região ITS encontrada no genoma é mais conservada quando comparada com as regiões do fator de alongação 1- α e beta-tubulina, dessa maneira, é mais eficiente na separação de gêneros. As regiões com níveis mais altos de mutações são indicadas para diferenciação entre as espécies. Por isso, é necessário que seja realizado o sequenciamento de mais de uma região genômica, já que elas são complementares no processo de identificação.

Tabela 4 - Acesso no *Genbank*, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região genômica ITS.

Espécie	Acesso no <i>GenBank</i>	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referências
<i>Fusarium sambucinum</i>	X65482	94	97	O'Donnell (1992)
<i>F. poae</i>	AF414966	94	96	Yli-Mattila et al. (2004)
<i>Gibberella pulicaris</i>	DQ026011.1	94	97	Moreno-Velázquez et al. (2005)
<i>F. venenatum</i>	FJ545225	94	97	Guajjari et al. (2009)*
<i>F. sambucinum</i>	X65481	94	96	O'Donnell (1992)
<i>F. poae</i>	AF414967	94	96	Yli-Mattila et al. (2004)
<i>F. acuminatum</i>	AB587001	94	95	Watanabe et al. (2011)*
<i>F. sporotrichioides</i>	FJ426386	94	95	Sun; Song (2009)

* Acessos lançados no *GenBank*, porém, ainda não publicados.

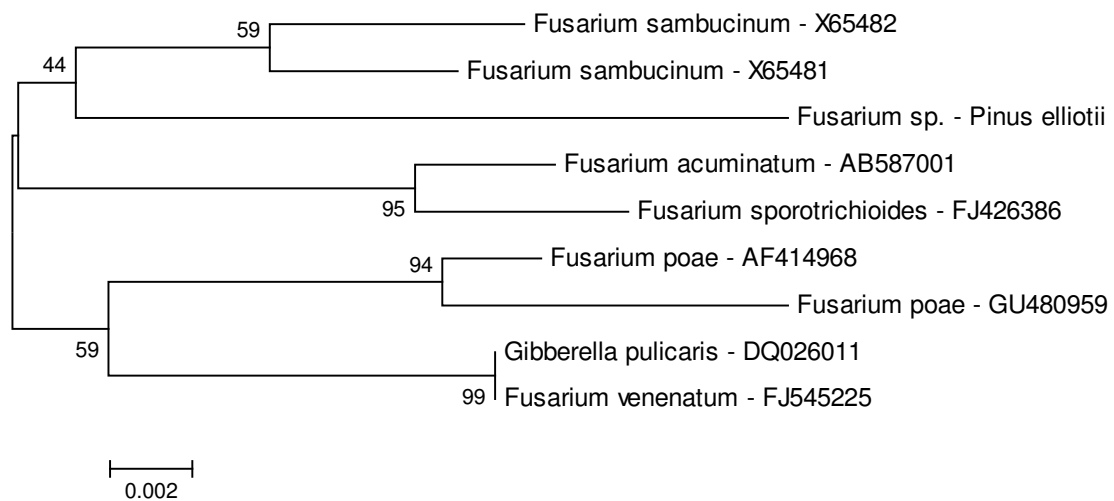


Figura 5 - Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região ITS. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). * Isolado de *Fusarium* sp. obtido no presente trabalho.

De acordo com Geiser et al. (2004), o gene que codifica o fator de alongação 1- α , tornou-se o marcador mais usual, visto que é um gene de cópia única, altamente informativo entre espécies relacionadas. A árvore filogenética confeccionada com a sequência da região do fator de alongação 1- α apresentou valores de *bootstrap* confiáveis (89%) com dois acessos da espécie *Fusarium sambucinum* (AJ543605 e AJ543602) e com um acesso de sua fase sexuada *Gibberella pulicaris* (JF776658) (Tabela 5 e Figura 7), além de elevados percentuais de cobertura e similaridade, que aumentam a confiabilidade do alinhamento.

Muitos acessos encontrados no *Genbank* não são 100% confiáveis, segundo Maharachchikumbura et al. (2011), uma vez que espécies importantes são depositadas nesses bancos públicos sem a conferência exata do nome do fungo, causando dúvidas no processo de identificação. A verificação da patogenicidade, a localização geográfica e o hospedeiro atacado, a caracterização morfológica e biológica de determinado isolado são passos cuidadosos e fundamentais para uma identificação precisa em termos de espécie, que vem com o objetivo de complementar a filogenia molecular (KRISTENSEN et al., 2005).

Tabela 5 – Acesso no *Genbank*, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região do fator de alongação 1- α .

Espécie	Acesso no <i>GenBank</i>	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Fusarium sambucinum</i>	AJ543605	96	95	Kristensen et al. (2005)
<i>F. sambucinum</i>	AJ543602	96	95	Kristensen et al. (2005)
<i>Giberella pulicaris</i>	JF776658	96	96	Tan et al. (2011)
<i>F. venenatum</i>	FJ939721	97	94	Nitschke et al. (2010)
<i>F. equiseti</i>	DQ842081	94	94	Punja et al. (2007)*
<i>F. kyushuense</i>	AB674297	95	89	Watanabe et al. (2011)
<i>F. culmorum</i>	GU370396	95	89	Obanor et al. (2010)
<i>F. langsethiae</i>	FJ768702	94	89	Yli-Mattila et al. (2010)*
<i>F. culmorum</i>	GU370467	95	89	Obanor et al. (2010)
<i>F. culmorum</i>	AF212462	95	89	O'Donnell (2000)

* Acessos lançados no *GenBank*, porém, ainda não publicados.

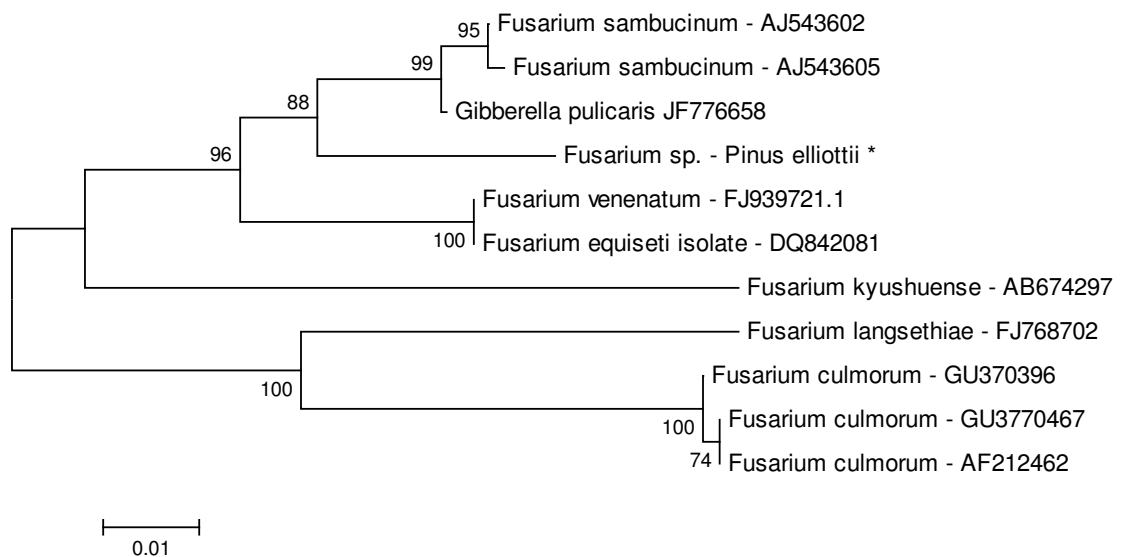


Figura 6 – Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região do fator de alongação 1 – α . Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). * Isolado de *Fusarium* sp. obtido no presente trabalho.

Com o sequenciamento da região beta-tubulina pode-se concluir a identificação molecular, já que a árvore filogenética, com base nessa sequência, apresentou *bootstrap* de

100% para um acesso, *Gibberella pulicaris* (AF484166), que corresponde à fase sexuada de *F. sambucinum*, com 100% de cobertura e 99% de similaridade. Esse resultado corrobora aos resultados obtidos nas outras regiões sequenciadas e a análise morfológica, na qual o isolado foi identificado como *Fusarium sambucinum*. Para Leslie e Summerell (2006), a combinação de conceitos filogenéticos e biológicos tem um alto potencial para a caracterização coerente em se tratando de espécie.

Na Figura 7 é possível observar, também, que um acesso de *Fusarium poae* (GQ915445) ficou próximo do *clade* onde está disposto o isolado de *Fusarium* sp. obtido no presente trabalho, porém, com um *bootstrap* de 60%, o que pode ser explicado pelo fato de *F. poae* fazer parte da seção *Sporotrichiella*, com características morfológicas semelhantes a seção *Discolor*, a mesma do *F. sambucinum* (forma sexuada *Gibberella pulicaris*). A codificação da região genômica beta-tubulina é utilizada com sucesso para diferenciar isolados semelhantes morfológicamente, pertencentes à mesma seção ou a seções diferentes. Por exemplo, Mach et al. (2004) utilizaram a região da beta-tubulina para identificar a espécie *F. langsethiae*, com características fenotípicas muito próximas às espécies pertencentes às seções *Discolor* e *Sporotrichiella*.

Tabela 6 – Acesso no *Genbank*, cobertura (%), similaridade (%) e referência das espécies utilizadas na construção do dendrograma filogenético da região beta – tubulina.

Espécie	Acesso no <i>GenBank</i>	Cobertura (%)	Similaridade (%)	Referência
<i>Gibberella pulicaris</i>	AF484166	100	99	Kawshuk et al. (2002)*
<i>G. zeae</i>	AY303689	100	97	Li et al. (2003)
<i>F. pseudograminearum</i>	JN862230	80	96	Fu;Li; Yuan (2011)*
<i>F. pseudogramineraum</i>	JN862231	80	96	Fu;Li; Yuan (2011)*
<i>F. culmorum</i>	GQ915440	78	96	Proctor et al. (2009)*
<i>F. sporotrichioides</i>	GQ915448	78	95	Proctor et al. (2009)*
<i>F. equiseti</i>	GQ915441	78	94	Proctor et al. (2009)*
<i>F. langsethiae</i>	HQ141643	75	95	Yli-Matilla et al. (2011)*
<i>F. longipes</i>	GQ915443	78	93	Proctor et al. (2009)*
<i>F. poae</i>	GQ915445	78	97	Proctor et al. (2009)*

* Acessos lançados no *GenBank*, porém, ainda não publicados.

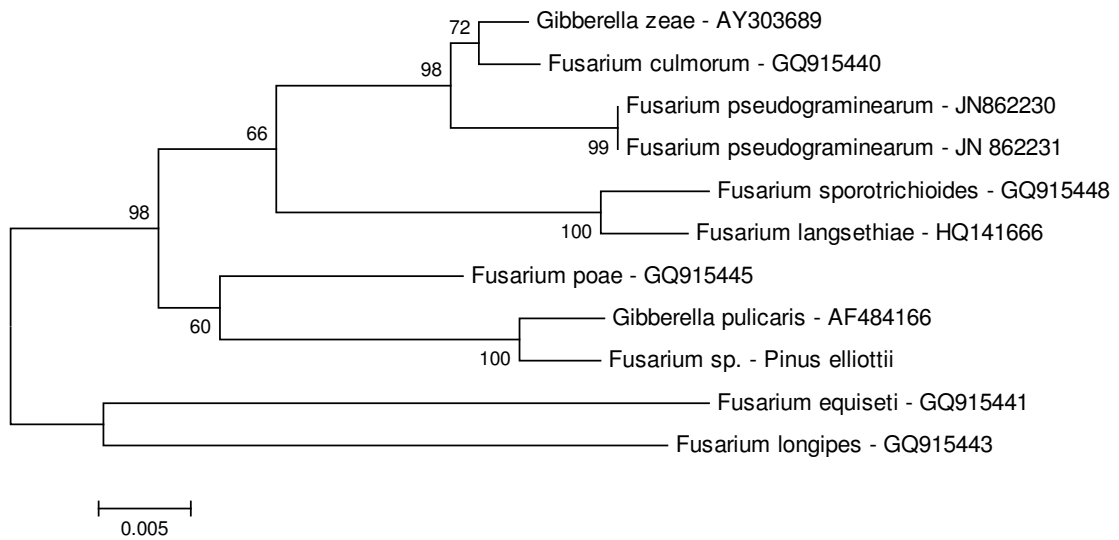


Figura 7 – Dendrograma filogenético baseado no método *Neighbor-joining* a partir de sequências de DNA da região beta - tubulina. Os números sobre os ramos indicam a porcentagem de repetições da análise de *bootstrap* na qual as repetições foram observadas (1000 repetições). * Isolado de *Fusarium* sp. obtido no presente trabalho.

4.5 Microbiolização em sementes de *Pinus elliotii*

Os resultados referentes aos testes em laboratório para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes de *Pinus elliotii* microbiolizadas estão apresentados na Tabela 7. Verifica-se que não ocorreu diferença significativa para a variável primeira contagem de germinação (PCG) entre os tratamentos, exceto para aqueles que a inoculação foi realizada somente via peliculização. O recobrimento acabou atuando como uma barreira que retarda a absorção de água e, conseqüentemente, o processo germinativo, ressaltando que essa situação foi maximizada uma vez que as sementes de *Pinus elliotii* já apresentam um tegumento rígido.

Os valores numéricos superiores foram observados quando as sementes passaram pelo processo de inoculação via contato com Agrotich Plus® (75%) e com Rizolyptus® (71%), assim como os menores índices de plântulas anormais 7 e 8%, respectivamente. Trabalhos de microbiolização de sementes com espécies de *Trichoderma* (MASTOURI et al., 2010; MARTELLETO, 2005) ou com rizobactérias (REDDY; RADE, 1989) evidenciaram a ocorrência de efeitos promotores significativos na germinação.

Com base nos resultados, pode-se constatar que a peliculização das sementes, sozinha, ou combinada com os produtos comerciais, retardou a germinação inicial e influenciou a germinação final aos 28 dias e, embora os valores não tenham diferido estatisticamente da testemunha para alguns tratamentos, estes foram inferiores (Tabela 7). Esses dados assemelham-se aos observados por Falck (2005) que constatou uma redução de até 40% na primeira e última contagem de germinação de sementes de *Pinus elliottii* submetidas ao recobrimento com três polímeros distintos. Romano (2003), por sua vez, observou uma queda na primeira contagem de germinação em sementes de *Eucalyptus saligna* Sm. e *E. grandis* W.Hill recobertas, porém elas mantiveram uma alta porcentagem de germinação final.

Tabela 7 – Valores médios de primeira contagem de germinação (PCG), germinação (G), plântulas anormais (PA) e sementes mortas (SM) de *Pinus elliottii*, após diferentes formas de microbiolização.

Tratamentos	Variáveis			
	(%)			
	PCG	G	PA	SM
T1 - Contato+Agrotich Plus [®]	68 a*	75 a	7,0b	18 b
T2 - Contato+Rizolyptus [®]	66 a	71 a	8,0b	21 b
T3 - Peliculização+Contato+ Agrotich Plus [®]	61 a	63,5 a	10b	26,5b
T4 - Peliculização+Contato+Rizolyptus [®]	51 a	61 a	21 ab	18 b
T5 - Peliculização+Agrotich Plus [®]	19 bc	25 bc	31 a	44 ab
T6 - Peliculização+Rizolyptus [®]	10 c	15 c	27 a	58 a
T7 - Rizolyptus [®]	54 a	65 a	14 ab	21 b
T8 - Agrotich Plus [®]	59 a	63 a	20 ab	17 b
T9 - Peliculização	46 ab	50 ab	19 ab	31 ab
T10 - Contato	69 a	70 a	16 ab	14 b
T11 - Sem tratamento	53 a	65 a	21 ab	14 b
C. V. (%)	23,94	19,66	20,5	25,3

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

C.V. (%) = coeficiente de variação.

Os resultados correspondentes à emergência de plântulas de *Pinus elliottii* aos 28 dias (Tabela 8) mantêm aqueles encontrados nos testes em laboratório (Tabela 7).

A combinação do método de inoculação via contato com Rizolyptus[®] (T1) e com Agrotich Plus[®] (T2) apresentou maiores valores numéricos de emergência, 90 e 86%, respectivamente (Tabela 8). Harthmann et al. (2009), avaliando o efeito da microbiolização de sementes de *Allium cepa* L. (cebola) com diferentes isolados de rizobactérias (*Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.), verificaram incrementos no diâmetro do pseudocaule, número de folhas e massa seca da parte aérea, em especial para aquelas tratadas com *Bacillus cereus*. Embora sem diferença estatística, observou-se um incremento no comprimento de plântulas, massa verde e massa seca para ambos os tratamentos citados em relação às testemunhas (Tabela 8). Hohmann et al. (2011) conduziram um estudo com sementes de *Pinus radiata* D. Don, testando o efeito de dois isolados de *Trichoderma* sp. (*T. hamatum* LU592 e *T. atroviride* LU132) e os métodos de inoculação do antagonista (peliculização e pulverização de suspensão de esporos após a semeadura), tendo constatado que ambos os métodos foram eficientes no processo de inoculação, com destaque para o isolado *T. hamatum* LU592, que demonstrou vários ganhos associados à qualidade da planta, tais como comprimento de plântula e massa seca radicular. Os autores associam esse ganho de crescimento à capacidade do fungo em colonizar a rizosfera das plantas, enquanto que, para Verma et al. (2004), a simples presença física da massa micelial na rizosfera das plantas aumenta a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento.

A emergência em substrato foi comprometida pelo uso do polímero, mostrando-se ineficiente, também, para a inoculação dos organismos antagônicos. Os resultados obtidos utilizando-se apenas a técnica de peliculização (T5 e T6) foram insatisfatórios, alcançando médias estatisticamente inferiores à testemunha (T11) (sem tratamento). Almeida et al. (2003) verificaram a redução de 50% na porcentagem de germinação em relação à testemunha de sementes de *Cedrela fissilis* recobertas com polímero. Observações similares foram realizadas por Ferreira (2001), em que o recobrimento influenciou a primeira contagem de germinação e o índice de velocidade de emergência de sementes de fumo, porém não interferiu na germinação final.

Tabela 8 – Avaliação da qualidade de plântulas de *Pinus elliottii*, obtidas de sementes microbiolizadas, através das variáveis: emergência aos 28 dias (E28), sementes não germinadas (SNG), comprimento de plântulas (CP), massa verde (MV) e massa seca (MS).

Tratamentos	Variáveis				
	E28 (%)	SNG (%)	CP cm/plântula	MV g/plântula	MS g/plântula
T1 - Contato+ Agrotich Plus [®]	86 a*	14 a	10,8 bc	2,23 a	0,26 a
T2 - Contato+Rizolyptus [®]	90 a	10 a	13,3 a	2,08 a	0,25 a
T3 - Peliculização+Contato+ Agrotich Plus [®]	78 a	21,5 ab	11,0 abc	1,79 a	0,18 a
T4 - Peliculização+Contato+ Rizolyptus [®]	76 a	24 b	11,4 abc	1,70 a	0,22 a
T5 - Peliculização+Agrotich Plus [®]	40 bc	60 c	7,8 d	0,50 bc	0,065 bc
T6 - Peliculização+Rizolyptus [®]	30 c	70 c	8,1 d	0,31 c	0,037 c
T7 - Rizolyptus [®]	80 a	20 ab	12,1 ab	1,86 a	0,22 a
T8 - Agrotich Plus [®]	78 a	22 ab	9,2 cd	1,4 ab	0,19 a
T9 - Peliculização	65 ab	35 b	11,4 abc	1,39 ab	0,16 ab
T10 - Contato	85 a	15 a	12,3 ab	2,14 a	0,23 a
T11 - Sem tratamento	80 a	20 ab	12,7 ab	1,83 a	0,22 a
C. V. (%)	18,56	12,5	9,15	25,02	24,3

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

C.V. (%) = coeficiente de variação.

Quando submetidas ao teste de sanidade, as sementes microbiolizadas apresentaram baixa incidência fúngica. Os gêneros que ocorreram com maior frequência, nos tratamentos, estão apresentados na Tabela 9. Na testemunha (sem tratamento – T11), além dos fungos apresentados, foram observados os gêneros *Rhizopus* (22%) e *Alternaria* (8%). No tratamento apenas com o polímero (T9), os gêneros *Epicoccum* (2%), *Cladosporium* (2%) e *Alternaria* (3%). Na testemunha com contato no meio BDA (T10), não foram identificados outros gêneros fúngicos.

Nos tratamentos (T5 e T8) (via peliculização e contato direto com o produto Agrotich Plus[®] (imersão em suspensão por 15 minutos)) em que houve incidência de 100% de *Trichoderma* spp. nas sementes, os demais patógenos foram erradicados. Sementes de soja tratadas com Agrotich[®] evidenciaram redução na incidência de *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. em até 60% quando comparadas com a testemunha (BRAND et al., 2009).

A competição por substrato é um dos mecanismos de ação do *Trichoderma* spp. quando em contato direto com outros patógenos (BETTIOL, 1991), por apresentar uma rápida multiplicação, acaba interferindo negativamente no desenvolvimento do patógeno. Manzoni et al. (2006) também obtiveram resultados de redução no percentual de incidência dos gêneros *Rhizopus* sp. e *Penicillium* sp. em sementes de aveia preta, quando tratadas com o bioprotetor Agrotrich®.

De maneira geral, a microbiolização das sementes com Rizolyptus® reduziu a incidência de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp., exceto quando o método de inoculação deu-se via contato em BDA, quando os percentuais de *Penicillium* sp. foram superiores numericamente à testemunha (sem tratamento).

Tabela 9 – Incidência média de fungos em sementes de *Pinus elliottii* após diferentes formas de microbiolização.

Tratamentos	Fungos (%)		
	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
T1 - Contato+ Agrotrich Plus®	88,0ab*	0,0d	0,0d
T2 - Contato+Rizolyptus®	0,0c	18,0cd	3,0d
T3 - Peliculização+Contato+ Agrotrich Plus®	75,0b	91,0a	0,0d
T4 - Peliculização+Contato+ Rizolyptus®	2,0c	96,0a	18,5bc
T5 - Peliculização+Agrotrich Plus®	100,0a	0,0d	0,0d
T6 - Peliculização+Rizolyptus®	0,0c	43,0bc	0,0d
T7 - Rizolyptus®	0,0c	17,0cd	4,0cd
T8 - Agrotrich Plus®	100,0a	0,0d	0,0d
T9 - Peliculização	21,0c	68,0ab	21,0b
T10 - Contato	0,0c	20,0cd	3,0d
T11 - Testemunha	0,0c	84,5a	64,0a
C.V. (%)	22,46	35,65	52,99

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

C.V. (%) = coeficiente de variação.

Na tabela 10, encontram-se os resultados da análise de contrastes ortogonais, realizada através da comparação de grupos de médias obtidos na análise da qualidade fisiológica das sementes de *P. elliotti*, após a microbiolização com diferentes métodos e microrganismos.

No primeiro contraste, pode-se notar que o tratamento das sementes de maneira geral, independente do método e do microrganismo (T1 à T10) quando comparado com as sementes não tratadas (T11), não interferiu significativamente nas variáveis de emergência, exceto para sementes não germinadas e comprimento de plântula, em que os resultados foram favoráveis para sementes não tratadas (Tabela 10). Isso ocorre porque, durante o contraste, faz-se a média de todos os tratamentos envolvidos no grupo, e quando um deles apresenta resultados baixos, influencia diretamente no valor final do grupo. No caso do contraste 1, o método da peliculização interferiu negativamente na média final, já que apresentou efeito prejudicial na germinação (Tabela 9). Dessa maneira, contrastes subsequentes e mais específicos são importantes para inferir os resultados.

Através do segundo contraste, pode-se afirmar que a microbiolização das sementes de *P. elliotii*, pelo método de contato em meio BDA, independente do microrganismo utilizado (T1 e T2), condiciona o aumento de plântulas normais, massa verde, massa seca e redução de plântulas anormais, quando comparado com sementes sem tratamento (T10 e T11). Esse método de inoculação faz com que as sementes permaneçam mais tempo em contato com o antagonista, aumentando o seu efeito benéfico.

A peliculização influenciou negativamente no percentual de plântulas normais, quando comparada com sementes não tratadas (contraste 3). E no quarto contraste, em que os métodos de inoculação foram comparados: contato com o microrganismo (T1 e T2) e peliculização (T5 e T6), os valores foram promissores em todas as variáveis para o grupo I.

No contraste 5, foram comparados os tratamentos com *Trichoderma* spp. (grupo I) e com *Bacillus subtilis* (grupo II). Houve incremento na emergência e redução no percentual de sementes não germinadas, para aquelas tratadas com *Trichoderma* spp., enquanto que o *B. subtilis* favoreceu o comprimento de plântulas. Para as variáveis, massa verde e massa seca, os agentes de biocontrole demonstraram resultados próximos. Sendo assim, independente do microrganismo, quando inoculado pelo método de contato, apresenta resultados promissores no desenvolvimento de plântulas de *P. elliotii*.

Tabela 10 - Contrastes ortogonais (Y1, Y2, Y3, Y4 e Y5) entre as médias dos grupos de 11 tratamentos para variáveis do teste de emergência em viveiro de sementes de *Pinus elliottii*, submetidas à microbiolização: emergência aos 28 dias (E28), sementes não germinadas (SNG), comprimento de plântula (CP), massa verde (MV) e massa seca (MS).

Contrastes ortogonais (Y)	E28(%)		SNG (%)		CP (%)		MV (%)		MS (%)	
	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05	Médias	p<0,05
Y1 = (T1 ⁽¹⁾ T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 T9 T10) x (-10T11)	55,85 a 65 a	0,127 ^{ns}	27,25 b 11,5 a	0,0310*	10,73 b 12,69 a	0,0007*	1,54 a 1,83 a	0,1768 ^{ns}	0,18 a 0,22 a	0,0848 ^{ns}
Y2 = (T1 T2) x (-T10)	73 a 70 a	0,6631 ^{ns}	19 a 14 a	0,5443 ^{ns}	12,05 a 12,27 a	0,7289 ^{ns}	2,16 a 2,14 a	0,9507 ^{ns}	0,25 a 0,23 a	0,4495 ^{ns}
Y3 = (T5 T6) x (-T9)	20 b 50 a	0,0001*	53,5 b 31 a	0,0094*	7,93 b 11,42 a	0,00001*	0,41 b 1,39 a	0,0003*	0,05 b 0,16 a	0,0004*
Y4 = (T1 T2) x (-T5 -T6)	73 a 20,0 b	0,00001*	19 a 53,5 b	0,00001*	12,05 a 7,93 b	0,00001*	2,16 a 0,41 b	0,00001*	0,25 a 0,05 b	0,00001*
Y5 = (T1 T3 T5 T8) x (-T2 -T4 -T6 -T7)	56,62 a 53 a	0,3643 ^{ns}	26,12 a 30,75 a	0,3335 ^{ns}	9,68 b 11,22 a	0,0001*	1,48 a 1,49 a	0,9609 ^{ns}	0,17 a 0,18 a	0,6708 ^{ns}

* Contraste significativo pelo teste F, em 5% de probabilidade de erro (p<0,05). ^{ns} Contraste não significativo pelo teste F, em 5 % de probabilidade de erro (p<0,05). ⁽¹⁾ Tratamentos: T1: Contato + Agrotlich Plus[®]; T2: Contato + Rizolyptus[®]; T3: Peliculização + Contato + Agrotlich Plus[®]; T4: Peliculização + Contato + Rizolyptus[®]; T5: Peliculização + Agrotlich Plus[®]; T6: Peliculização + Rizolyptus[®]; T7: Aplicação direta de Agrotlich Plus[®]; T8: Aplicação direta de Rizolyptus[®]; T9: somente peliculização; T10: somente contato com BDA e T11: sem tratamento.

4.6 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotlich Plus[®] e Rizolyptus[®] *in vitro* sobre *Fusarium sambucinum*

Na Figura 8, estão contidos os resultados do teste de confronto direto do patógeno com os agentes de biocontrole.

Trichoderma spp., na forma comercial Agrotlich Plus[®] foi eficiente na redução do crescimento micelial do fungo *Fusarium sambucinum* e o crescimento do patógeno só foi permitido até 96 horas de incubação. Nas 24 horas seguintes, *Trichoderma* spp. reduziu a área colonizada pelo patógeno, multiplicando-se sobre o mesmo. Bonfim et al. (2010) destacaram uma rápida ação antagônica de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizopus stolonifer*, com inibição do crescimento micelial do patógeno em apenas 72 horas de confronto. De acordo com os autores, essa redução do crescimento da colônia do fitopatógeno, na presença de *Trichoderma* spp., pode estar vinculada à liberação de metabólitos pelo antagonista.

Neste estudo, a ação antagônica de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium sambucinum*, conforme a escala de Bell et al. (1982), recebe nota 2, que constitui a ocupação de 2/3 da placa pelo antagonista aos sete dias. Aos 10 dias de confronto, foi possível observar a colonização de toda a placa pelo *Trichoderma* spp., inclusive a região com crescimento do patógeno. Ru e Di (2012) visando o controle de *F. sambucinum*, causador de podridão seca de batatas na China, testaram o efeito, *in vitro*, de 10 isolados de *Trichoderma* spp. e encontraram resultados satisfatórios, com destaque para *Trichoderma longibrachiatum* (D-3-1).

Quando confrontado com a bactéria *Bacillus subtilis* (Rizolyptus[®]), pode-se observar um crescimento mais rápido do patógeno que, até as primeiras 48 horas, se aproximou da testemunha (apenas *Fusarium sambucinum*) (Figura 8). No momento em que as estruturas do patógeno aproximaram-se do antagonista, verificou-se que houve uma interrupção no crescimento do patógeno, ocorrendo a formação de um halo de inibição entre o patógeno e o antagonista. Segundo Asaka e Shoda (1996), essa eficiência na atividade *in vitro* apresentada por *B. subtilis* a diferentes tipos de patógenos está associada à capacidade que essa bactéria tem em produzir antibióticos como *iturina A* e *sufactina*, capazes de atuar na inibição do crescimento micelial de fungos.

Figueiredo et al. (2010) constataram a eficiência *in vitro* da bactéria *Bacillus subtilis* (CNPMS-22) contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium moniliforme*, *Exserohilum turcicum*, *Acremonium striticum* e *Colletotrichum sublineolum*, causadores de doenças nas

culturas do milho e do sorgo. Baldotto et al. (2010) também encontraram resultados promissores no confronto de bactérias endofíticas e *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*.

No teste *in vitro*, foi possível verificar que os dois agentes biológicos *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* foram eficazes no controle de *F. sambucinum*, evidenciando o potencial para testes *in vivo* (Figura 9).

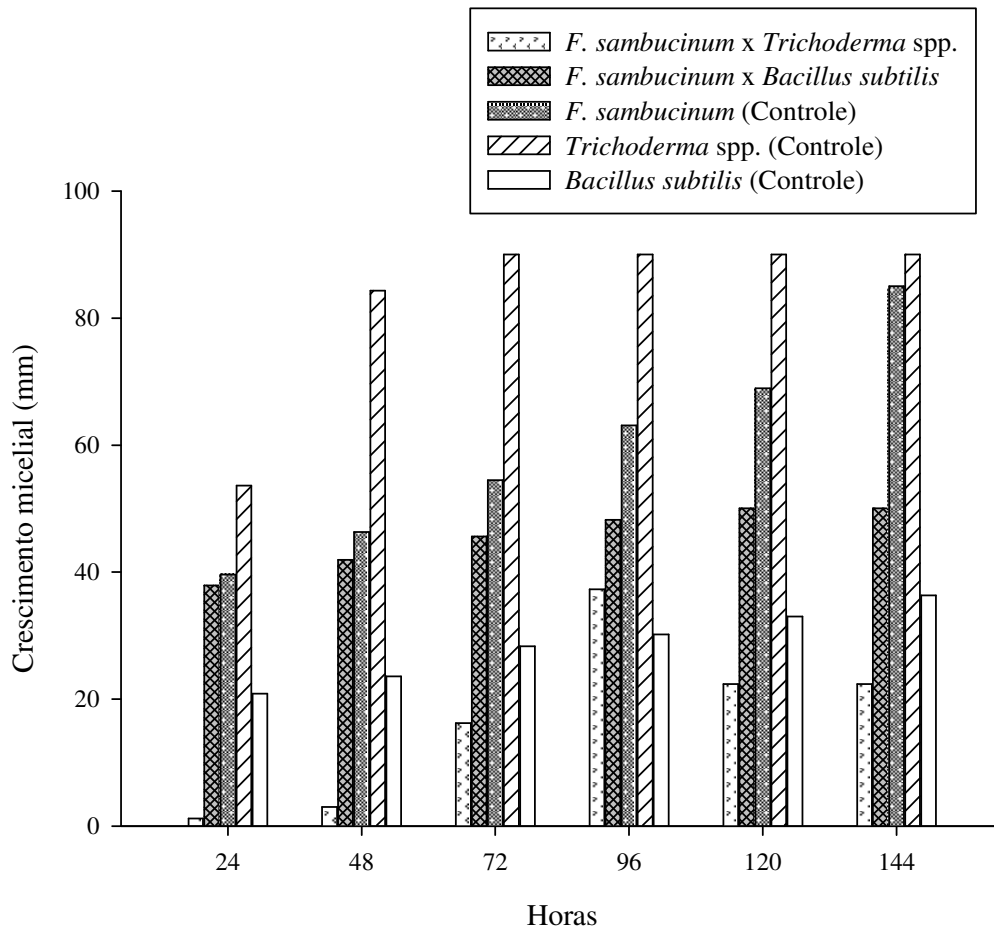


Figura 8 - Crescimento micelial (mm) de *Fusarium sambucinum* no confronto direto: *F. sambucinum* x *Trichoderma* spp. e *F. sambucinum* x *Bacillus subtilis*; e testemunhas: apenas *F. sambucinum*, apenas *Trichoderma* spp. e apenas *B. subtilis*.

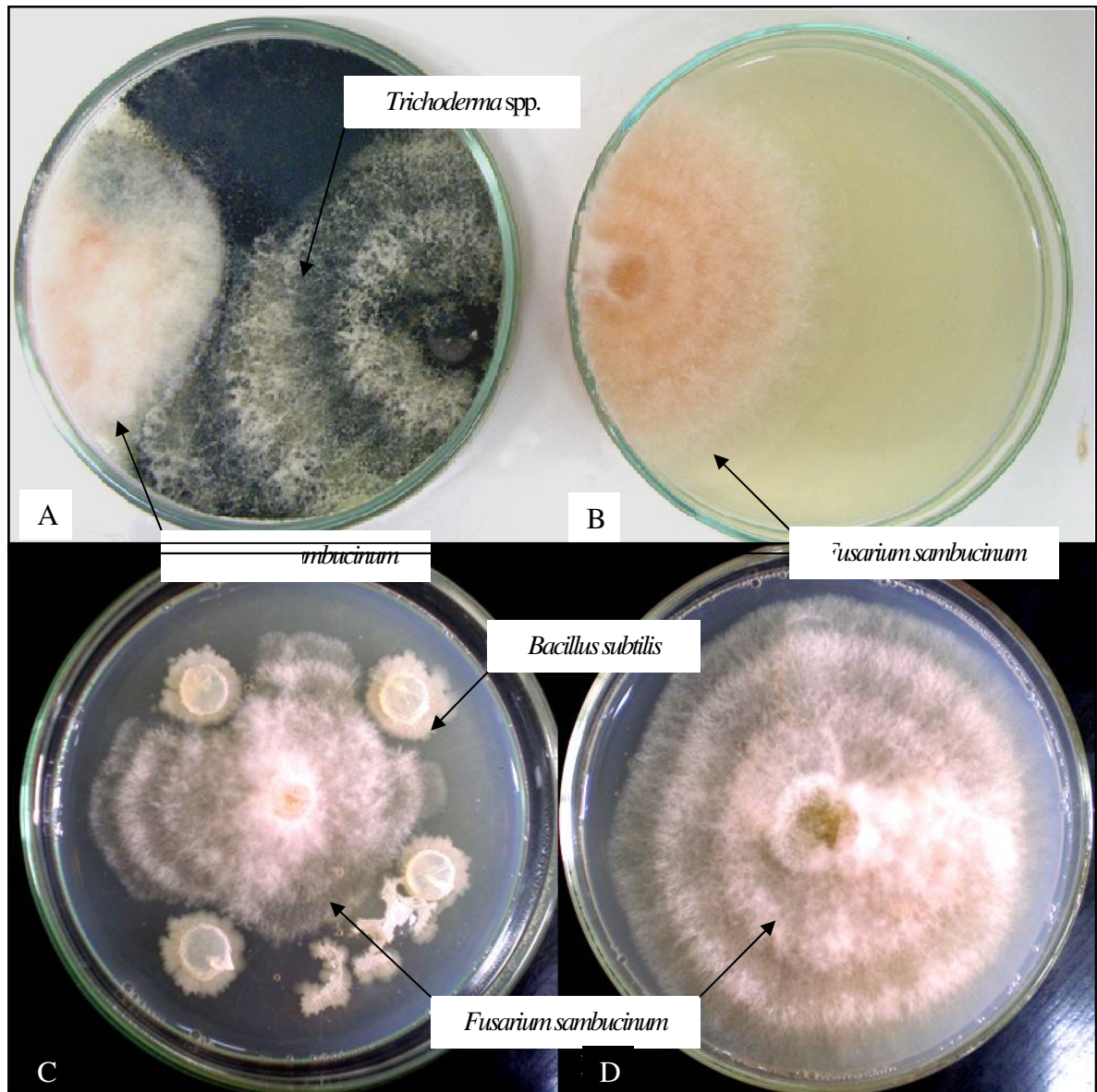


Figura 9 – Confronto direto *in vitro*: *Fusarium sambucinum* x *Trichoderma* spp. (A); testemunha (B); *F. sambucinum* x *Bacillus subtilis* (C); testemunha (D). Após três e seis dias de incubação a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas, respectivamente, para *Trichoderma* spp. e *B. subtilis*.

4.7 Atividade de biocontrole dos produtos Agrotich Plus[®] e Rizolyptus[®] *in vivo* sobre *Fusarium sambucinum*

Devido à complexidade envolvida na erradicação de fungos que sobrevivem internamente à semente, como *Fusarium* sp., a alternativa mais promissora para o seu controle é a eliminação ou a redução do inóculo, em especial, nas sementes e nos restos culturais. Os resultados da qualidade final de mudas de *Pinus elliottii* submetidas a tratamentos com bioprotetores visando o controle do fungo *Fusarium sambucinum* estão apresentados na Tabela 10.

O percentual de plântulas emergidas aos sete dias (Tabela 11) foi inferior àquele obtido na primeira contagem de germinação em laboratório (Tabela 7), isso pode estar associado às condições do processo de produção de mudas encontradas no viveiro (tubetes de 50 cm³ e casa de vegetação com temperatura ambiente de ≈ 25 °C). Os tratamentos que se destacaram na contagem aos sete dias foram aqueles cuja inoculação foi via contato, independente da presença do fungo ou não. A água presente no meio BDA atua como agente estimulador, promovendo o amolecimento do tegumento, facilitando a penetração do oxigênio e aumentando o volume do embrião, estimulando, assim, as atividades metabólicas básicas (MARCOS FILHO, 1986) e favorecendo a emergência.

Os resultados obtidos aos 21 dias apresentaram diferença significativa para alguns tratamentos. O confronto *in vivo* do patógeno *F. sambucinum* e a bactéria antagonista *Bacillus subtilis* (Rizolyptus[®]) destacou-se entre os demais, apresentando um percentual de germinação que diferiu da testemunha (sem tratamento) e foi superior a maioria dos outros tratamentos (Tabela 11). A forma de inoculação via contato pode ter facilitado essa ação, já que a semente ficou mais tempo em contato com ambos os microrganismos, se comparada com a inoculação via peliculização.

Os mecanismos envolvidos na ação antagônica de *B. subtilis* são dois: antagonismo direto ao fitopatógeno, através dos mecanismos da antibiose, como síntese de substâncias antimicrobianas e compostos voláteis, competição por espaço e nutrientes (LEELASUPHAKUL et al., 2008); e o mecanismo indireto, exercido pelo fenômeno de resistência sistêmica induzida (LANNA FILHO et al., 2010), no qual moléculas sintetizadas por *B. subtilis* geram uma resposta de defesa contra os patógenos.

Kupper et al. (2003) encontraram resultados promissores com o uso de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. na supressão da germinação de conídios de *Colletotrichum*

acutatum, *in vitro*, além da redução dos sintomas causados pelo fungo em flores e maior produtividade do fruto de lima-ácida (“Tahiti”). Gomes (2000) testou o efeito *in vitro* e *in vivo* de *B. subtilis* e *Trichoderma* spp. sobre o fungo *Cylindrocladium spathulatum*, agente causal da pinta-preta em *Ilex paraguariensis* (erva-mate), sendo que o autor encontrou resultados promissores para ambos os antagonistas no teste *in vitro*. No entanto, no teste de biocontrole com mudas, o isolado de *B. subtilis* (A49) destacou-se entre os demais, reduzindo em 90% a incidência da doença, quando comparado com a testemunha.

A contagem final deu-se aos 42 dias após a instalação dos testes, quando foi verificado tombamento nas mudas e também desprendimento delas do substrato nos tratamentos em que ocorreu inoculação do fungo *Fusarium sambucinum*. Essas plântulas não desenvolveram raízes secundárias, comuns no sistema radicular de uma plântula normal e, dessa forma, ficaram mais suscetíveis às ações da irrigação. O material foi então retirado, a fim de avaliar os demais parâmetros sem perdas de resultados.

Ainda na Tabela 11, as sementes tratadas com o bioprotetor Agrotlich Plus® evidenciaram percentual de emergência, aos 42 dias, estatisticamente igual ao da testemunha, mesmo nos casos onde o patógeno *F. sambucinum* foi inoculado. Esse resultado pode estar associado à capacidade do *Trichoderma* spp. em controlar os microrganismos prejudiciais para as sementes, presentes na rizosfera. De acordo com Baker (1989; 1991), o controle de patógenos secundários, que diminuem o crescimento e a atividade das raízes, é um dos mecanismos de fungos do gênero *Trichoderma* que resultam no aumento do rendimento das plântulas.

Quando a inoculação do fungo foi realizada via peliculização e, posteriormente, a semente foi tratada diretamente com o produto a base de *Trichoderma* spp., a emergência superou a testemunha em 10 %. Após a incubação em câmara úmida das plântulas retiradas do viveiro, foi possível observar a associação do antagonista *Trichoderma* spp. com o sistema radicular das mesmas. A habilidade desenvolvida pelo *Trichoderma* spp. na promoção do crescimento de plantas está relacionada, entre outros fatores, à sua capacidade de associação simbiótica as raízes das plantas (HARMAN et al., 2004; SANTOS, 2008).

Em câmara úmida, foi constatada a presença do patógeno associado à parte aérea e radicular das mudas com sintomas. *Trichoderma* spp. foi verificado no sistema radicular das plântulas desenvolvidas a partir de sementes inoculadas com Agrotlich Plus® (Figura 10). Quando o material foi plaqueado em meio BDA, visualizou-se tanto a presença do antagonista *Trichoderma* spp. quanto do patógeno *F. sambucinum*, comprovando que os dois microrganismos estavam associados às sementes (Figura 10).



Figura 10 – Fragmentos de *Pinus elliottii* em câmara úmida (BDA e papel-filtro) após teste de biocontrole. T7 – Peliculização + *Fusarium sambucinum* x Agrotrich Plus[®]; T5 - Peliculização + *F. sambucinum* x Contato + Agrotrich Plus[®]; T2 – Contato + *F. sambucinum* x Contato + Rizolyptus[®] e T1 – Contato + *F. sambucinum*.

Em relação ao percentual de plântulas tombadas, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos, variando de 1% para os tratamentos com inoculação de *Fusarium sambucinum* x Agrotrich[®] até 8% para aquelas sementes inoculadas com *F. sambucinum* e tratadas com Rizolyptus[®] (Tabela 11). Lazzaretti e Bettioli (1997) testaram um produto formulado a base de células e metabólitos de *Bacillus subtilis*, visando ao controle de patógenos importantes para as culturas do arroz, trigo, feijão e soja. Segundo os autores, o tratamento de sementes de soja com o formulado mostrou-se estatisticamente semelhante ao fungicida quintozene (225g/100 kg de sementes) no controle de *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis phaseoli* e *Fusarium* spp.

Apesar de não ter sido observado diferença significativa, as sementes inoculadas com o patógeno *Fusarium sambucinum* e, posteriormente, tratadas com Rizolyptus[®], demonstraram redução no percentual de sementes mortas, comparado com os demais tratamentos e, conseqüentemente, um aumento na emergência final aos 42 dias (Tabela 11). Luz (2001) registrou um aumento no rendimento dos grãos de milho utilizando sementes tratadas com rizobactérias, em especial *Bacillus subtilis*. Segundo Asaka e Shoda (1996), o tratamento de sementes de tomate com *B. subtilis* (RB-14C) aumentou a massa seca dos brotos e reduziu a incidência de tombamento de mudas causado por *Rhizoctonia solani*.

Tabela 11 – Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de *Pinus elliottii*, através das variáveis: emergência aos sete (E7), emergência aos 21 (E21) e emergência aos 42 dias (E42), plântulas tombadas (PT) e sementes não germinadas (SNG).

Tratamentos	Variáveis (%)				
	E7	E21	E42	PT	SNG
Contato+ <i>Fusarium sambucinum</i>	4 bc	28 bc	51 ab	6,0 a	43 abc
Contato+ <i>F. sambucinum</i> x Contato+Rizolyptus [®]	20 a	55 a	67 a	8,0 a	25 c
Contato+ <i>F. sambucinum</i> x Rizolyptus [®]	4 bc	15 bc	44 ab	4,0 a	52 abc
Contato+ <i>F. sambucinum</i> x Agrotich Plus [®]	12 b	31 abc	57 ab	3,0 a	40 abc
Peliculização+ <i>F. sambucinum</i> x Contato+Agrotich Plus [®]	11 b	32 abc	54 ab	2,0 a	44 abc
Peliculização+ <i>F. sambucinum</i> x Rizolyptus [®]	0 c	11 bc	36 bc	6,0 a	58 ab
Peliculização+ <i>F. sambucinum</i> x Agrotich Plus [®]	0 c	36 ab	66 a	1,0 a	33 bc
Peliculização+ <i>F. sambucinum</i>	0 c	8 c	34 c	1,0 a	65 a
Sem tratamento	1 c	29 bc	57 ab	5,0 a	38 abc
C.V.(%)	24,4	20,41	23,69	32,12	29,18

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

C.V. (%) = coeficiente de variação.

Para o comprimento da parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos, por outro lado, o comprimento da parte radicular variou de 7,94 cm até 11,78 cm, para a testemunha e as sementes inoculadas com *Fusarium sambucinum* e tratadas com Rizolyptus[®], respectivamente (Tabela 12). Este último tratamento destacou-se também para o comprimento total de plântulas, massa verde e seca, sendo superior a todos os demais. Outros

pesquisadores já observaram efeito benéfico com promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus* spp. produzido por *Bacillus subtilis* (MAFIA et al., 2007; MAFIA et al., 2009).

Zarpelon (2007), testando a resposta da rizobacterização de mudas de diferentes clones de eucalipto com o produto Rizolyptus[®] na forma turfosa e líquida, concluiu que a taxa de enraizamento e a biomassa aérea seca foi superior à testemunha em todos os tratamentos onde se utilizou o produto, indiferente da forma. Souza Júnior (2010) concluiu que a utilização de combinações de rizobactérias eficientes na microbiolização de sementes de arroz permite o controle de doenças (queima das bainhas e nematóide das galhas), comuns na cultura, bem como a promoção do crescimento vegetal.

Tabela 12 – Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de *Pinus elliottii*, através das variáveis: comprimento da parte aérea (PA), comprimento da parte radicular (PR), comprimento total (CT), massa verde (MV) e massa seca (MS).

Tratamentos	PA	PR	CT	MV	MS
	cm/plântula	cm/plântula	cm/plântula	g/plântula	g/plântula
T1-Contato+ <i>F. sambucinum</i>	7,32 a	10,62 ab	17,95 ab	2,94 cd	0,42 bc
T2-Contato+ <i>F. sambucinum</i> x Contato+Rizolyptus [®]	7,27 a	11,78 a	19,05 a	4,66 a	0,67 a
T3-Contato+ <i>F. sambucinum</i> x Rizolyptus [®]	7,11 a	10 ab	17,1 abc	2,65 d	0,37 c
T4-Contato+ <i>F. sambucinum</i> x Agrotich Plus [®]	7,36 a	10,19 ab	17,55 ab	3,22 bc	0,46 bc
T5-Películação+ <i>F. sambucinum</i> x Contato+Agrotich Plus [®]	7,35 a	9,65 bc	17 abc	3,03 bcd	0,47 b
T6-Películação+ <i>F. sambucinum</i> x Rizolyptus [®]	6,75 a	8,77 bc	15,52 bc	1,54 f	0,25 d
T7-Películação+ <i>F. sambucinum</i> x Agrotich Plus [®]	6,9 a	10,51 ab	17,41 abc	3,42 b	0,51 b
T8-Películação+ <i>F. sambucinum</i>	7,27 a	9,48 bc	16,75 abc	2,98 cd	0,42 bc
T9-Testemunha	6,99 a	7,94 c	14,93 c	2,21 e	0,26 d
C.V.(%)	7,03	7,89	6,03	6,15	9,33

*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

C.V. (%) = coeficiente de variação.

De maneira geral, os tratamentos que continham o produto biológico Agrotich Plus[®] a base de *Trichoderma* spp., obtiveram resultados positivos com relação ao vigor de plântulas, ressaltando, mais uma vez, o potencial do antagonista sobre o patógeno e também na promoção do crescimento de plantas. Na concepção de Lucon (2009), a promoção de

crescimento esteve, inicialmente, associada apenas ao controle dos microrganismos fitopatogênicos, porém, com estudos mais específicos, foi possível relacionar esta característica à produção de hormônios ou a outros fatores de crescimento, uma vez que algumas espécies de *Trichoderma* spp. aumentam a superfície total do sistema radicular, possibilitando um maior acesso aos elementos minerais presentes nele.

Na Tabela 13, encontram-se os valores da análise de contrastes ortogonais, realizada através da comparação de grupos de médias resultantes dos dados de qualidade fisiológica das sementes de *P. elliotii*, após o confronto *in vivo* de *F. sambucinum* e os agentes biológicos (*Trichoderma* spp. e *B. subtilis*).

Embora sem diferença significativa, o contraste 1 permite concluir que, quando as sementes foram inoculadas com o patógeno via contato em meio BDA, houve uma redução no percentual de emergência aos 42 dias e um aumento nas sementes não germinadas, em relação à testemunha. No segundo contraste, que compara o método de inoculação via peliculização com a testemunha, essas diferenças foram mais evidentes e significativas para as variáveis massa verde e seca. Porém, como discutido anteriormente, o método foi ineficaz para inoculação, já que mascarou os resultados, interferindo negativamente na germinação.

Através do contraste 3, pode-se observar que o tratamento das sementes de *P. elliotii* com o método do contato em meio BDA, independente do microrganismo (*Trichoderma* spp. ou *B. subtilis*) é promissor no controle de *F. sambucinum*. Verificou-se incremento na germinação e comprimento de plântulas e redução no percentual de plântulas tombadas (dados não significativos). Para massa verde e massa seca foi possível constatar diferença significativa entre os valores.

Quando comparado o efeito da microbiolização com *B. subtilis* x *Trichoderma* spp., independente do método utilizado (contraste 5), pode-se concluir que, apenas para a variável massa verde, as médias foram significativas, favorecendo o grupo de tratamentos com *B. subtilis*. Para as demais variáveis, salientou-se uma diferença numérica pequena entre a aplicação dos microrganismos, sugerindo que ambos são eficientes no controle do patógeno.

No contraste 6, comparou-se a eficiência entre os microrganismos, inoculados diretamente na semente contaminada pelo patógeno. Neste caso, foi possível verificar que, para todas as variáveis, exceto para plântulas tombadas, o *Trichoderma* spp. apresentou resultados numéricos superiores a *B. subtilis*, com diferença estatística para massa seca e massa verde. Segundo Nakagawa (1999), sementes mais vigorosas proporcionam maior transferência de matéria seca de seus tecidos de reserva para o eixo embrionário, na fase de

germinação, originando plântulas com maior peso, que pode ser quantificado pelas variáveis massa verde e seca.

Tabela 13 – Contrastes ortogonais (Y1, Y2, Y3, Y4, Y5 e Y6) entre as médias dos grupos de nove tratamentos para variáveis do teste de emergência em viveiro de sementes de *Pinus elliottii* inoculadas com *Fusarium sambucinum* e submetidas à microbiolização: emergência aos 42 dias (E42), plântulas tombadas (PT), sementes não germinadas (SNG), comprimento total de plântula (CT) massa verde (MV) e massa seca (MS).

Contrastes ortogonais	E42		PT		SNG		CT		MV		MS	
	Médias	p<0,005	Médias	p<0,005	Médias	p<0,005	Médias	p<0,005	Médias	p<0,005	Médias	p<0,005
Y1 = T1 x - T9	51 a	0,4951 ^{ns}	5 a	1,00 ^{ns}	43 a	0,5882 ^{ns}	17,86 a	0,1384 ^{ns}	2,97 a	0,9235 ^{ns}	0,42 a	0,7912 ^{ns}
	57 a		5 a		38 a		16,75 a		2,98 a		0,41 a	
Y2 = T8 x - T9	34 a	0,0133 ^{ns}	1 a	0,2344 ^{ns}	65 a	0,0064 ^{ns}	14,93 a	0,0179 ^{ns}	2,21 b	0,00001*	0,26 a	0,00001 *
	57 a		5 a		38 a		16,75 a		2,98 a		0,41 b	
Y3 = 3 T1 x (-T2 - T3 - T4)	51 a	0,4863 ^{ns}	5 a	0,6235 ^{ns}	43 a	0,5957 ^{ns}	17,86 a	0,9443 ^{ns}	2,97 b	0,00001 *	0,42 b	0,0032 *
	56 a		3,6 a		39 a		17,9 a		3,51 a		0,49 a	
Y4 = (T5 T6 T7) x - 3T8	52 a	0,0171 ^{ns}	4 a	0,2737 ^{ns}	45 a	0,0123 ^{ns}	16,64 a	0,0073 ^{ns}	2,66 a	0,0002 *	0,4 a	0,00001 *
	34 a		1 a		65 a		14,93 a		2,21 b		0,26 b	
Y5 = (T2 T3 T6) x (-T4 - T5 - T7)	49 a	0,056 ^{ns}	4,33 a	0,6037 ^{ns}	45 a	0,2647 ^{ns}	17,2 a	0,8188 ^{ns}	2,95 b	0,001 *	0,43 a	0,0068 ^{ns}
	59 a		3,3 a		39 a		17,3 a		3,2 a		0,47 a	
Y6 = T3 x - T4	44 a	0,1456 ^{ns}	2 a	0,5482 ^{ns}	52 a	0,1995 ^{ns}	17,1 a	0,5392 ^{ns}	2,65 b	0,0001 *	0,36 b	0,0027 *
	57 a		4 a		40 a		17,55 a		3,22 a		0,46 a	

* Contraste significativo pelo teste F, em 5% de probabilidade de erro (p<0,05). ^{ns} Contraste não significativo pelo teste F, em 5% de probabilidade de erro (p<0,05). ⁽¹⁾ Tratamentos: T1: Contato + *F. sambucinum*; T2: Contato + *F. sambucinum* x Contato + Rizolyptus[®]; T3: Contato + *F. sambucinum* x Rizolyptus[®]; T4: Contato + *F. sambucinum* x Agrottrich Plus[®]; T5: Peliculização + *F. sambucinum* x Contato + Agrottrich Plus[®]; T6: Peliculização + *F. sambucinum* x Rizolyptus[®]; T7: Peliculização + *F. sambucinum* x Agrottrich Plus[®]; T8: Peliculização + *F. sambucinum* e T9: sem tratamento.

Na Tabela 14, encontram-se os resultados da diluição serial do substrato. A ausência do antagonista (*Trichoderma* spp.) e do patógeno (*Fusarium sambucinum*) na testemunha atestam que não houve interferência de contaminações destes fungos no substrato utilizado.

No caso do tratamento T2 - contato + *Fusarium sambucinum* x Agrotich Plus[®] foi possível verificar apenas a presença do *Trichoderma* spp., sugerindo que houve uma ação antagonica sobre o fungo *Fusarium* sp., reduzindo a sua multiplicação no substrato. O mesmo resultado, contudo, não foi constatado no confronto Peliculização + *Fusarium sambucinum* x Agrotich Plus[®].

Tabela 14 - Diluições de substrato. Presença (+) e ausência (-) de *Trichoderma* spp. e *Fusarium sambucinum* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	<i>Trichoderma</i> spp.	<i>F. sambucinum</i>
Contato + <i>F. sambucinum</i>	(-)	(+)
Contato + <i>F. sambucinum</i> x Agrotich Plus [®]	(+)	(-)
Peliculização + <i>F. sambucinum</i> x Agrotich Plus [®]	(+)	(+)
Peliculização + <i>F. sambucinum</i>	(-)	(+)
Testemunha	(-)	(-)

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode se chegar as seguintes conclusões:

- Contato com a cultura fúngica por 48 horas é o método mais eficiente para inoculação de *Fusarium sambucinum* em sementes de *Pinus elliottii*;

- A técnica da peliculização interferiu no processo germinativo das sementes, mascarando os resultados do teste de patogenicidade, não sendo indicada para inoculação de *Fusarium sambucinum*;

- O isolado de *Fusarium* sp. patogênico ao *Pinus elliottii* é *Fusarium sambucinum*, causando tombamento e murcha de plântulas, apodrecimento dos cotilédones e lesão seguida de ruptura do hipocótilo;

- O tratamento das sementes com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. via contato com a cultura do antagonista por 48 horas é eficiente na promoção da germinação;

- Tanto *Bacillus subtilis* quanto *Trichoderma* spp. são eficientes no controle *in vitro* de *F. sambucinum*;

- *Bacillus subtilis* na forma comercial Rizolyptus[®] é promissor no biocontrole *in vivo* de *F. sambucinum*, proporcionando maior vigor às plântulas e reduzindo as perdas ocasionadas pelo patógeno.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. **Anuário estatístico da ABRAF 2011**. Ano base 2010 /ABRAF. – Brasília: 2011. 130p.

ALMEIDA, N. O. de; OLIVEIRA, J. A.; DAVIDE A. C. Avaliação das germinação de sementes peletizadas de *Cedrela fissilis* Vell. visando semeadura direta no campo. **Resumo**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 12., cidade. **Anais...** Cidade: Editora, 2003. p. 366-366.

ALTOMARE, C. et al. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, Bari, v. 65, n. 7, p. 2926-2933. 1999.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 25, n. 17, p. 3389-3402. 1997

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagonista de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 565-568, 2002.

ANGELOTTI, F. et al. Caracterização morfológica e identificação molecular de isolados de *Fusarium graminearum* associados à giberela do trigo e triticale no sul do Brasil. **Summa phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 2, p. 177-179, 2006.

ARAÚJO, E. R. **Qualidade fisiológica, etiologia e patogenicidade de fungos assinalados em sementes de aroeira produzidas em três municípios da Paraíba**. 2008. 45 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba. Areia - PB, 2008.

ASAKA O.; SHODA M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 62, n. 11, p. 4081–4085, 1996.

AUER, C. G.; GOMES, N. S. B.; GRIGOLETI JÚNIOR, A. **Armilariose em Pinus no Brasil**. Colombo: Embrapa Florestas, 2004. 5 p. (Comunicado técnico 117)

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).

- BACKES, P.; IRGANG, B. **Árvores cultivadas no sul do Brasil: Guia de identificação e interesse paisagístico das principais espécies exóticas.** Porto Alegre: Paisagem do Sul, v. 1, 2004. 204 p.
- BACON, C. W. et al. Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize. **Environmental Health Perspectives**, [S.l.], v. 109, p. 325-332, 2001. Suplemento 2.
- BAKER, R. Diversity in biological control. **Crop Protection**, Maryland Heights, v. 10, n. 2, p. 85-94, 1991.
- BAKER, R. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. **Trends of Biotechnology**, [S.l.] v.7, n. 2, p.34-38, 1989.
- BALARDIN, C. R. et al. Possibilidade de transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão vermelha da raiz da soja, através da semente. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 6, p. 574-581, 2005.
- BALDOTTO, L. E. B. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3 Ed. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1999. 241 p.
- BELL, D. K.; WELLS, H. D.; MARKHAM, C. R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, [S.l.], v. 72, n. 4, p.379-382, 1982.
- BENETTI C. S. et al. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 79-83, 2009.
- BEREMAND, M. N. et al. Survey of *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) for mating type trichothecene production, and other selected traits. **Phytopathology**, [S.l.], v. 81, n. 11, p. 1452-1458, 1991.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol W. (Ed). **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, p. 1-5, 1991.
- BETTIOL, W.; GHINI, R. Impacto das mudanças climáticas sobre o controle biológico das doenças de plantas. In: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. (Ed). **Biocontrole de Doenças em Plantas: usos e perspectivas.** Jaguariúna. Embrapa-CNPMA, p. 29-33, 2009.

- BOMFIM, M. P. et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 61-67. 2010.
- BRAND, S. C. et al. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de soja submetidas a tratamento com bioprotetor e fungicida. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 31, n.4, p. 87-94, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para análise de sementes**. Brasília, DF, 2009.
- CARNEIRO, J. S. **Teste de sanidade em sementes de essências florestais**. In: SOAVE, J. WETZEL, M. M. V. Patologia de sementes. Campinas: Abrates/Cargil, p. 386-394, 1987.
- 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.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.
- CHEROBINI, E. A. I. **Avaliação da qualidade de sementes e mudas de espécies florestais nativas**. 2006. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2006.
- CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 165-180, 2005.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. St Paul. APS, 1983, 539 p.
- CORDEIRO, Z. J. M.; KIMATI, H. Doenças em bananeira. In KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 112-135, 2005.
- CORRÊA, F. E. **Viabilidade prática de *Bacillus subtilis*, para controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, 2010.

DINIZ K. A. et al. Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 28, n. 3, p.37-43, 2006.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, [S.l.], v. 12, p. 13-15, 1991.

ETHUR, L. Z. **Dinâmica populacional e ação de *Trichoderma* no controle de fusariose em mudas de tomateiro e pepineiro**. 2006. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2006.

ETHUR, L. Z. et al. Seleção de antagonistas fúngicos a *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* em substrato comercial para mudas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1801-1804, 2007.

FALCK, G. L. **Recobrimento de sementes de *Pinus elliottii* Engelm como alternativa para semeadura direta em campo**. 2005. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, 2005.

FARIAS, A. X. de. et al. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 3, p. 617-621, 2000.

FERNANDES, M. R. **Manual para laboratório de fitopatologia**. Passo Fundo: EMBRAPA-CNPT, 1993. 128 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises estatísticas e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Minas Gerais, v.6, n. 2, p.36-41, 2008.

FERREIRA, M. L. **Influência da peletização na qualidade de sementes de fumo (*Nicotina tabacum* L.)**. 2001. 17 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS, 2001.

FIGUEIREDO, J.E.F. et al. **Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo**. XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia: Associação Brasileira de Milho e Sorgo. CD-Rom, p. 667-673, 2010.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Ação de rizobactérias sobre a incidência de *Colletotrichum gossypii* e promoção de crescimento em plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 23, n. 1, p. 36-41, 1997.

FREITAS, S. S.; PIZZINATTO, M. A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 17, n. 2, p. 105-112, 1991.

GAIND, S.; GAUER, A. C. Thermotolerant phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mugbean. **Plant and Soil**, [S.l.], v. 133, n. 1, p. 141-149, 1991.

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.

GARCIA JÚNIOR, D. ***Fusarium graminearum* em sementes de trigo (*Triticum aestivum* L.)**: detecção, efeitos e controle. 2006. 78 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo – SP, 2006.

GEISER, D. M. et al. FUSARIUM-ID v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, [S.l.], v. 110, n. 5-6, p. 473-479, 2004.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium* – a pictorial atlas**. Berlin: Biologische Bundesanstalt für Land – und. Forstwirtschaft. 1982, 406 p.

GOLLE, D. P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas**. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2007.

GOMES, N. S. B. **Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum*, agente causal da pinta-preta em erva-mate**. 2000. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, PR, 2000.

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. **Fusariose em mudas de *Pinus taeda***. Colombo: Embrapa Florestas, 2006. 3 p. (Comunicado técnico 166).

GUPTA, V. K.; MISRA, A. K.; GAUR, R. K. Growth characteristics of *Fusarium* spp. causing wilt disease in *Psidium guajava* l. in Índia. **Journal of Plant Protection Research**, [S.l.], v. 50, n. 4, p. 451-462, 2010.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S.l.], v. 41, n. 41 p. 95-98. 1999.

HARLOW, W. M.; HARRAR, E. S. **Textbook of dendrology**. New York: McGraw-Hill, 1969. 512 p.

HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, [S.l.], v. 2, p. 43-56, 2004.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, Minnesota, v.84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HARTHMANN O. E. L. et al. Tratamento de sementes com rizobactérias na produção de cebola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 9, p. 2533-2538, 2009.

HOHMANN P. et al. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**, [S.l.], v. 115, n. 8, p. 759-767, 2011.

HOMECHIN, M.; PIZZINATTO, M. A.; MENTEN, J. O. M. Sanidade de sementes de *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* e patogenicidade de *Fusarium oxysporum* em plântulas de *Pinus elliottii* var. *elliottii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 12, n. 1/2, p. 102-112, 1986.

HOWEL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, Minnesota, v. 87, n. 1, 2003. 10 p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2010/default.shtm>> Acesso em: 16 abr. 2012.

KLEIFELD, O.; CHET, I. *Trichoderma*: plant interaction and its effects on increased growth response. **Plant and Soil**, Holanda, v. 144, n. 2, p. 267-272, 1992.

KRISTENSEN, R. et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. **Mycological Research**, [S.l.], v. 109, n. 2, p. 173-186, 2005.

KRONKA, F. J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. **A cultura do Pinus no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. 160 p.

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.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. de. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadina, v. 4, n. 2, 2010, 9 p.

LASCA, C. C.; NOGUEIRA, E. M. C.; PITTA, G. P. B. Condições fitossanitárias de sementes de *Pinus elliottii* Engelm. Produzidas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 4, n. 1, 1978, 12 p.

LAZAROTTO, M. **Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cedro e patogenicidade de *Rhizoctonia* spp.** 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2010.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; SANTOS, A. F. dos. Detecção, transmissão, patogenicidade e controle químico de fungos em sementes de paineira (*Ceiba speciosa*). **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 2, p. 134-139, 2010.

LAZZARETTI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agrícola**, São Paulo, v. 54, n. 1-2, p. 89-96, 1997.

LEELASUPHAKUL, W.; PUNPEN H.; CHUENCHITT S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. **Postharvest. Biology and Technology**, [S.l.], v. 48, n. 1, p. 113-121, 2008.

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

LI, H. et al. Cloning of beta-tubulin gene from *Gibberella zeae* and analysis its relationship with carbendazim-resistance. **Wei Sheng Wu Shue Bao**, China, v. 43, n. 4, p. 424-429, 2003.

LI, J. et al. Isolation and identification of the pathogens of potato fungus diseases during storage in Gansu Province. **Journal of Lanzhou University Natural Sciences**, [S.l.], v. 43, n. 2, p. 39-42, 2007.

LIMA, F. F. **Bacillus subtilis e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho.** 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Piauí – PI, 2010.

LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil: madeiras ornamentais e aromáticas.** São Paulo: Nova Odessa/Instituto Plantarum, 2003. 368 p.

LUCON, C. M. M. Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. In: INFOBIBOS – INFORMAÇÕES TECNOLÓGICAS, 2009. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_1/trichoderma/index.htm>. Acesso em: 11 mar. 2012.

LUCON, C. M. M.; MELO, I. S. Seleção de rizobactérias antagônicas a *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica, em tubérculos de batata. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 25, n. 2, p. 132-136, 1999.

LUDWIG J. et al. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 322-328, 2009.

LUZ, W. C. da. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n.1, p.16-20, 2001.

LUZ, W. C. da. Microbiolização de sementes para o controle de doenças. In: LUZ, W. C. da. et al. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RS: RAPP, v. 1, p. 33-77. 1993. 417 p.

MACH, R. L. et al. Specific detection of *Fusarium langsethiae* and related species by DGGE and ARMS-PCR of a h-tubulin (tub1) gene fragment. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 95, n. 3, p. 333–339, 2004.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças.** LAPS: UFLA: FAEPE, Lavras, MG. 2000. 138 p.

_____. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Brasília: Ministério da Educação: ESAL: FAEPE, 107 p. 1988.

MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 589-597, 2007.

MAFIA, R. G. et al. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 33, n. 1, p. 1-9, 2009.

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

MANZONI, C. G. et al. Tratamento sanitário de sementes de aveia-preta com *Trichoderma* sp., extrato vegetal e agroquímico. In: JORNADAS DE JOVENS PESQUISADORES DA AUGM, XIV, Campinas, 2006. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2006.

MARASAS, W. F. O.; NELSON, P. E.; TOUSSON T. A. **Toxigenic *Fusarium* species: Identity and mycotoxicology.** Pennsylvania State University Press, University Park. 1984, 328p.

MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N. et al. Pestalotiopsis—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. **Fungal Diversity**, Chiang Mai, v. 50, n. x, p. 167-187, 2011.

MARCHIORI, J. N. C. **Dendrologia das gimnospermas.** Santa Maria: UFSM, 1996. 158 p.

MARCOS FILHO, J. Germinação de sementes. In: CICERO, S. M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R. (Coords.). **Atualização em produção de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, p. 11-39, 1986.

MARIANO, R. de L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle biológico de patógenos de plantas. In: FERNANDES, J. M. C.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. Passo Fundo: **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 1993, v.1, p. 369-409. 417 p.

MARTELLETO, M.S. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. para o tratamento de sementes de tomate visando a proteção contra patógenos de solo e de armazenamento e promoção de crescimento.** 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro – RJ, 2005.

MARTIS-CORDER, M. P.; MELO, I. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *Verticillium dahliae* KLEB. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 55, n.1, p. 1-7, 1998.

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

MELO, I. S. Potencialidades da utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (ed.). **Controle Biológico de Doenças de Plantas**. Jaguariúna: CNPDA/EMBRAPA, p. 135-156. 1991

_____. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998.

MICHEREFF, S. J. **Controle biológico de doenças de plantas**. Universidade Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia. 2001. 145 p.

MILANESI, P. **Caracterização, toxigenicidade e patogenicidade de isolados de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto**. 2009. 91 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria – RS, 2009.

MENDES, M. A. S. et al. **Fungos em plantas no Brasil**, Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CENARGEN. 1998. 569 p.

MENDES, S. S. et al. Levantamento, patogenicidade e transmissão de fungos associados às sementes de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth). **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 36, n.1, p. 118–122, 2005.

MORAES, M. H. D. Análise sanitária de sementes tratadas. In: VII Simpósio Brasileiro de Patologia de sementes, 2004. **Anais...** João Pessoa, 2004. 99 p.

MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria da Agricultura, 1961. 73 p.

MORENO-VELÁZQUEZ, et al. Diversidad de hongos en semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su caracterización molecular. **Revista Mexicana de Fitopatología**, [S.l.], v. 23, n. 2, p. 111-118, 2005.

MOURA, A. B.; ROMEIRO, R. da S.; NEVES, M. C. P. Bioensaio para avaliação massal de actinomicetos antagonistas a *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 12, p. 2065-2072, 1998.

MUNIZ, M. F. B; PORTO, M. D. M. Presença de *Alternaria* spp. em diferentes partes da semente de cenoura e em resíduos culturais e efeito do tratamento de sementes na sua transmissão. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 187-193, 1999.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F. C et al. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, p. 1-20.

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.

NITSCHKE, E.; NIHLGARD, M.; VARRELMANN, M. Differentiation of eleven *Fusarium* spp. isolated from sugar beet, using restriction fragment analysis of a polymerase chain reaction-amplified translation elongation factor 1alpha gene fragment. **Phytopathology**, [S.l.], v. 99, n. 8, p. 921-929, 2009.

OBANOR, F. et al. *Fusarium culmorum* is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis. **Fungal Biology**, [S.l.], v. 9, n. 114, p. 753-765, 2010.

OCAMB, C. M.; JUZWIK, J.; MARTIN, F. B. *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: root disease pathogens and taxa associated with seed. **New Forests**, [S.l.], v. 24, p. 67–79, 2002.

O'DONNELL, K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). **Current Genetics**, [S.l.], v. 22, n. 3, p. 213-220, 1992.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, [S.l.], v. 90, n.3, p. 465-493, 1998.

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

O'DONNELL, K. et al. Gene genealogies reveal global phylogeographic structure and reproductive isolation among lineages of *Fusarium graminearum*, the fungus causing wheat scab. **Proceedings of the National Academy of Sciences of de United States of America**, Washington, v. 97, n. 14, p. 7905-7910, 2010.

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

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,

forense, ambiental, agronômica, animal e alimentar – **Resumo das comunicações:** Bragança, 2011, 27 p.

PAULA JÚNIOR T. J. et al. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central brasileira:** 2007- 2009. Viçosa MG. EPAMIG-CTZM, 2008.

PEREIRA, R. M. et al. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1921-1927, 2008.

POLETTI, I.; CECONI, D. E.; MUNIZ, M. F. B. Ocorrência de *Fusarium* sp. causando mortalidade de mudas de erva-mate em viveiro na região alta do Vale do Taquari, RS. In: SEMINÁRIO SOBRE REFLORESTAMENTO E RECUPERAÇÃO AMBIENTAL, 2005, Lajeado. **Anais...**, Lajeado - RS: UNIVATES, 2005. p. 126-132.

POLETTI, I. **Nutrição, sombreamento e antagonismo biológico no controle da podridão-de-raízes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hill).** 2008, 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria – RS, 2008.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente.** Brasília: AGIPLAN, 1985, 2ª. Ed. 289 p.

QUERALES, P. J. **Caracterização morfológica e genética de *Fusarium spp.* isolado de sementes e associados a podridão do colmo do milho (*Zea mays L.*).** 2010, 81 f. Tese (Doutorado em Ciências – Fitopatologia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo – SP, 2010.

REDDY, M. S; RADE, J. E. *Bacillus subtilis* B-2 and selected onion rhizobacteria in onion seedling rhizospheres: Effects on seedling growth and indigenous rhizosphere microflora. **Soil Biology and Biochemistry**, [S.l.], v. 21, n. 3, p. 379-383, 1989.

REGO, S. S. **Germinação, morfologia e sanidade de sementes de *Blepharocalyx salicifolius* (H.B.K.) Berg e *Myrceugenia gertii* Landrum – Myrtaceae.** 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR, 2008.

REHNER, S. A., BUCKLEY, E. A. *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. **Mycologia**, [S.l.], v. 97, n. x, p. 84– 98, 2005.

ROMANO, C. M. **Peletização de sementes de *E. grandis* W. Hill ex Maidem e *E. saligna* Sm.** 2003. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Sementes) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS, 2003.

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.

SA, D. A. C. de. et al. Transporte, patogenicidade e transmissibilidade de fungos associados às sementes de pinhão manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 33, n. 4, p. 663-670, 2011.

SANTOS, G. R. dos; ARAÚJO, E.; BRUNO, R. de L.A. Investigações preliminares sobre a detecção e patogenicidade da micoflora de sementes de urucu (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 1, p. 13-15, 1992.

SANTOS, M. de F.; RIBEIRO, W. R. C.; FAIAD, M. G. R.; SANO, S. M. Fungos associados às sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 135-139, 1997.

SANTOS, A. F. dos., GRIGOLETTI JÚNIOR, A.; AUER, C. G. Transmissão de fungos por sementes de espécies florestais. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1/2, p. 119-128, 2000.

SANTOS, H. A. *Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporium*. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado) Universidade da Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília - DF, 2008.

SANTOS, A. F. dos; MACIEL, C. G.; FOWLER, J. A. P. **Detecção de fitopatógenos em sementes de pupunheira e transmissão de *Fusarium* sp. para plântulas**. Colombo: EMBRAPA – CNPF, 2011, 3p. (Comunicado Técnico, 277).

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**, [S.l.], v. 86, n.5, p.515-522, 1996.

SCHROERS, H. J. et al. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. **Mycologia**, [S.l.], v. 101, n. 1, p. 44–70, 2009.

SILVA, J. R. C. et al. Bactérias endofíticas no controle e inibição in vitro de *Pseudomonas syringae* pv. tomato, agente da pinta-bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4 p.1062-1072, 2008.

SOTTERO A. N. et al. 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.

SOUZA JUNIOR, I. T. **Controle biológico de doenças do arroz: ampliação do espectro de ação e promoção de crescimento pelo uso de combinações de rizobactérias eficientes.** 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) Universidade Federal de Pelotas. Pelotas – RS, 2010

SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D. J.; HOLL, F. B. Influence of indoleacetic acid producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, [S.l.], v. 42, n. 10, p. 1006-1014, 1996.

SUASSUNA, J. **A cultura do pinus: uma perspectiva e uma preocupação.** In: FUNDAJAV – FUNDAÇÃO JOAQUIM NABUCO. 1977. Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=760&Itemid=376>. Acesso em: 16 abr. 2012.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, Minnesota, v. 87, n. 2, p. 117-128, 2006.

SUN X. et al. Postharvest Chitosan Treatment Induces Resistance in Potato Against *Fusarium sulphureum*. **Agricultural Sciences in China**, [S.l.], v. 7, n. 5, p. 615-621, 2008.

TAMURA, K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 596-1599, 2007.

TAN, D.C. et al. Mycotoxins produced by *Fusarium* species associated with annual legume pastures and ‘sheep feed refusal disorders’ in Western Australia. **Mycotoxin Research**, [S.l.], v. 27, n. 2, p. 123-135, 2011.

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

TOLEDO, F. F. de; MARCOS FILHO, J. M. **Manual das sementes: tecnologia e produção.** São Paulo: ed. Agronômica Ceres, 1977. 224 p.

TUMBALAM, W. P.; KIRK, W. W. First report of potato tuber sprout rot caused by *Fusarium sambucinum* in Michigan. **Plant Disease**, Minnesota, v. 90, p. 1460, 2006.

URBEN, A. F. et al. **Curso sobre Taxonomia de *Fusarium* spp.**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos, 2009. 1 folder.

VECHIATO, M. H. Importância da qualidade sanitária de sementes de florestais na produção de mudas. 2010. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2010_3/SementesFlorestais/index.htm>. Acesso em: 26 mar. 2012.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos: Parte I - história, meios e procedimentos de cultivo. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 7, p. 271-298, 1999.

VENTURA, J. A. Taxonomia de *Fusarium* e seus segredos. Parte II - Chaves para identificação. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.8, p.303-338, 2000.

VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, [S.l.], v. 37, n. 1, 2007, 20 p.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R, ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*). In KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia**, 4 ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, v. 2, p. 165-180, 2005.

YLI-MATTILA, T., et al. Phylogenetic relationship of *Fusarium langsethiae* to *Fusarium poae* and *Fusarium sporotrichioides* as inferred by IGS, ITS, beta-tubulin sequences and UP-PCR hybridization analysis. **International Journal of Food Microbiology**, [S.l.], v. 95, n. 3. p. 267-285, 2004.

ZARPELON, T. G. **Caracterização de rizobactérias e eficiência do *Rizolyptus*[®] no enraizamento e crescimento do eucalipto**. 2007. 69 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa – MG, 2007.

WAALWIJK, C. et al. Discordant groupings of *Fusarium* spp. from Sections *Elegans*, *Liseola* and *Dlaminia* based on ribosomal ITS1 and ITS2 sequences. **Mycologia**, [S.l.], v. 88, n.3 p. 361-368, 1996.

WATANABE, M. et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes. **BMC Evolutionary Biology**, [S.l.], v. 11, n. 1, 2011, 322 p.

WEISING, K. et al. **DNA fingerprinting in plants and fungi**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 322 p.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A. et al. (eds.). **PCR protocols**: a guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990. p. 315 - 322.

ANEXOS

ANEXO 1 - 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 – Agar (FCA ou CLA)

- 15 g de ágar;
- 1 L de água destilada;
- folhas de cravo (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 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 2 - Descrição dos produtos comerciais utilizados no trabalho.

AGROTRICH PLUS[®] é um produto biológico à base do fungo *Trichoderma* spp. na quantidade de 10^8 UFCs g^{-1} de produto e farinha de arroz qsp 1,0 kg, na forma de pó seco solúvel altamente concentrado para o tratamento de sementes ou pulverização. É eficaz para prevenção de vários fungos e doenças de solo como *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Verticillium*, *Roselinea*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Phomopsis*. Pode ser aplicado via substrato (2 $g\ kg^{-1}$ de substrato), via semente (200 a 250 $g\ ha^{-1}$ misturado às sementes), via adubo (2 $kg\ ha^{-1}$ misturado ao adubo) e via solo (2 $g\ m^{-2}$ incorporados superficialmente) e é recomendado para as culturas de soja, trigo, feijão, café, batata, tomate, pimentão e demais hortaliças. Informações obtidas no rótulo do produto.

RIZOLYPTUS[®] é um inoculante biológico indicado para otimizar o enraizamento de estacas de eucalipto, tem como principio 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.

POLYSEED CF[®] é um polímero para sementes sua utilização dará mais uniformidade e fixação dos defensivos sobre as sementes e maior valor final às sementes recobertas. Indicado para uma grande variedade de grãos, como milho, soja, feijão, girassol, arroz e outros. As dosagens variam conforme as substâncias usadas, diluição, tipo de equipamento, recobrimento desejado, tamanho de semente e outros. Informações obtidas do site do produto (<http://www.rigrantec.com.br/site/view/produtos.php?id=43>).

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.