

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**THAISA WENDHAUSEN RAMOS DA SILVA**

**ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. COM SEMENTES DE *Pinus taeda*: DETECÇÃO,  
TRANSMISSÃO, PATOGENICIDADE E BIOCONTROLE**

**CURITIBA**

**2013**

**THAISA WENDHAUSEN RAMOS DA SILVA**

**ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. COM SEMENTES DE *Pinus taeda*: DETECÇÃO,  
TRANSMISSÃO, PATOGENICIDADE E BIOCONTROLE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Garcia Auer

**CURITIBA**

**2013**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGRONOMIA - PRODUÇÃO VEGETAL



## PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal, reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO, apresentada pela candidata **THAISA WENDHAUSEN RAMOS DA SILVA**, sob o título "**ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium spp.* COM SEMENTES DE *Pinus taeda*: DETECÇÃO, TRANSMISSÃO, PATOGENICIDADE E BIOCONTROLE**", para obtenção do grau de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Produção Vegetal do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2013.

Professora Dra. Louise Larissa May De Mio  
Coordenadora do Programa

Professor Dr. Dauri José Tessmann  
Primeiro Examinador

Dra. Bárbara Eckstein  
Segunda Examinadora

Dr. Alvaro Figueredo dos Santos  
Presidente da Banca e Orientador

**“Talvez a melhor medida da grandeza de uma pessoa seja a sua capacidade de sofrer”**

**(M. Scott Peck)**

À minha querida avó Dejanira Batista da Silva (*in memoriam*),  
tenho muito orgulho de ser sua  
primeira neta Mestre.

**Dedico...**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, o criador e a fortaleza de todos os caminhos, pelo dom da vida;

Ao meu noivo Alexandre José, e aos seus pais Antônio e Crysia pelo apoio, carinho e atenção nos momentos difíceis;

Aos meus pais Tânia e Oledir pela vida, amor, educação, princípios e pela confiança no meu trabalho;

Ao meu irmão Rodrigo, grande amor, amizade e exemplo;

À minha avó Elba por todo carinho e amor e por dedicar horas diárias de orações pelo meu sucesso;

Ao meu orientador Prof. Dr. Álvaro Figueredo dos Santos pelos ensinamentos, conselhos e paciência durante a construção do trabalho;

Ao Prof. Dr. Dauri José Tessmann da Universidade Estadual de Maringá pela identificação molecular de *Fusarium*.

À Universidade Federal do Paraná, Setor de ciências Agrárias e ao curso de Pós Graduação de Produção Vegetal, pela oportunidade. Em especial à Prof<sup>a</sup> Dra. Larissa May de Mio pela orientação prévia a este projeto.

À Prof<sup>a</sup> Dra. Lucimeris Ruaro pelo incentivo e por exaltar meu potencial antes de iniciar o curso de mestrado.

À Lucimara, secretária do curso de Pós Graduação, pelas orientações e atenção durante o andamento do curso;

À Embrapa Florestas, pela oportunidade, receptividade e apoio no Laboratório de Patologia Florestal na realização dos meus experimentos.

Aos funcionários da Embrapa Florestas Caroline, Adilson, Luziane, Edilson, Celso e, especialmente, ao Davi que contribuíram decisivamente para a realização deste projeto.

Aos meus amigos da Embrapa Florestas Hágata, Bárbara, Karen, Flávia, Carola, Marjorie, Francine, José Antônio e, em especial, ao José Carlos que, não só contribuíram com o meu trabalho, mas também dispuseram de carinho e amizade.

Aos meus amigos Ana Cláudia, Giselda, Verônica, Leandro, Julio César, Darling e Livia pelos conselhos e ensinamentos nos momentos mais delicados.

À CAPES, pela bolsa sucedida.

## RESUMO

*Pinus taeda* é uma espécie de importância econômica no setor florestal e suas sementes podem estar suscetíveis à perda de qualidade sanitária devido a sua associação com *Fusarium* spp., agente causal da podridão de raiz (PR) acarretando em perdas de plântulas no viveiro. O presente trabalho teve como objetivos: a) determinar o melhor método de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *P. taeda*; b) verificar a possível transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas; c) desenvolver uma escala descritiva de notas para avaliar a severidade da PR em mudas de *P. taeda*; d) avaliar a patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium subglutinans*; e) avaliar a eficiência do controle biológico e químico *in vitro* e *in vivo*. Para detecção de *Fusarium* spp. nas sementes foram aplicados três tratamentos: T1- blotter test; T2: papel cartão; T3- meio seletivo. A transmissão de *Fusarium* spp. foi avaliada em seis lotes de sementes de *P. taeda*. Foi avaliada a patogenicidade, agressividade e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de doze isolados de *Fusarium subglutinans* em mudas de *P. taeda*. Nos testes de controle biológico *in vitro* e *in vivo* foram utilizados três isolados de *Trichoderma* spp., exceto no pareamento de culturas os quais foram utilizados doze isolados de *Trichoderma* spp. Para o tratamento químico *in vitro* e *in vivo* das sementes foi utilizado tiofanato metílico + clorotalonil. Os testes de controle *in vitro* foram realizados pelo método do pareamento de culturas (antagonista x patógeno), produção de metabólitos voláteis, não voláteis e através da microbiolização das sementes com *Trichoderma* spp. Os testes *in vivo*, foram desenvolvidos em condições de viveiro. O método mais eficiente de detecção de *Fusarium* spp. nas sementes foi o meio seletivo. Não houve transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas de *P. taeda*, no entanto *Fusarium* spp. causou apodrecimento na fase de germinação nos seis lotes de sementes avaliados. A escala descritiva elaborada permitiu avaliar a evolução dos sintomas da doença PR em mudas de *P. taeda*. Nove isolados de *Fusarium subglutinans* se mostraram patogênicos a mudas de *P. taeda* e o isolado L3R2 exibiu maior agressividade e AACPD. Houve efeito da produção de metabólitos voláteis e não voláteis por *Trichoderma* spp. na redução do crescimento do fitopatógeno. A microbiolização e o tratamento químico das sementes de *P. taeda* reduziram a incidência de *Fusarium* spp. em condições *in vitro*. Nos testes *in vivo*, a microbiolização das sementes de *P. taeda* promoveu maior velocidade de emergência das plântulas, maior percentagem de plântulas saudáveis, redução da percentagem de sementes não germinadas (SNG) e de SNG com *Fusarium* spp. Houve efeito positivo dos tratamentos químico e biológico no crescimento de plântulas. Os tratamentos biológico e químico se mostraram eficientes e promissores no controle de *Fusarium* spp. e apresentaram efeito positivo no crescimento das plântulas de *P. taeda*.

Palavras-chave: Patologia florestal. Semente florestal. Controle biológico. Microbiolização.

## ABSTRACT

*Pinus taeda* is a species of great economic importance in the forestry sector and its seeds can be susceptible to loss of sanitary quality because of its association with *Fusarium* spp., which is the causing agent of root rot (RR) that generates losses of seedlings in nursery. This study aimed to define: a) the best detection method of *Fusarium* spp. in seeds of *P. taeda*; b) check the possible transmission of *Fusarium* spp. from seeds to plantlets; c) develop a descriptive scale for assessing the severity of RR in seedlings of *P. taeda*; d) evaluate the isolated pathogenicity of *Fusarium subglutinans*.; e) evaluate the efficiency of biological and chemical control *in vitro* and *in vivo*. For detection of *Fusarium* spp. in seeds three treatments were applied: T1 – blotter test; T2 – paper card; T3 – selective medium. The transmission of *Fusarium* spp. was evaluated in six batches of *P. taeda*'s seeds. The pathogenicity, aggressiveness and area under the disease progress curve (AUDPC) of twelve isolates of *Fusarium subglutinans* were evaluated in seedlings of *P. taeda*. A descriptive scale of notes was developed to evaluate the severity of PR in seedlings of *P. taeda*. In the biological control tests *in vitro* and *in vivo* three isolates of *Trichoderma* spp. were used, except on the pairing of cultures, in which twelve isolates of *Trichoderma* spp. were used. For the chemical treatments *in vitro* and *in vivo* in seeds methyl thiophanate + chlorothalonil were used. The control tests *in vitro* were took place by the pairing of culture methods (antagonist x pathogen), production of volatile metabolites, non-volatile and by the seeds microbiolization with *Trichoderma* spp. The tests *in vivo* were developed in vivarium conditions. The most efficient detection method of *Fusarium* spp. in seeds was the selective medium. There were no transmission *Fusarium* spp. seeds to seedlings of *P. taeda*, however *Fusarium* spp. rot caused at the stage of germination of seeds in six batches evaluated. The descriptive scale developed allowed to evaluate the evolution of the disease RR symptoms in *P. taeda*'s seedlings. Nine isolated *Fusarium subglutinans* showed to be pathogenic to seedlings of *P. taeda* and the isolated L3R2 exhibited more aggressive and AUDPC. There was an effect in the production of metabolites volatile and non-volatile by *Trichoderma* spp. in reducing pathogen growth. The microbiolization and the chemical treatment of *P. taeda*'s seeds reduced of phytopathogen growth. The microbiolization and the chemical treatment of *P. taeda*'s seeds reduced the incidence of *Fusarium* spp. under *in vitro* conditions. On the *in vivo* tests, the microbiolization of *P. taeda*'s seeds promoted higher speed in the emergence of plantlets, higher percentage of healthy plantlets, reduction of percentage of non-germinated seeds (NGS) and the NGS with *Fusarium*. There was positive effect of the chemical and biological treatments in the plantlets growth. The biological and chemical treatments showed to be efficient and promising in the control of *Fusarium* spp. and its deleterious effects on plantlets. It also showed positive effect on plantlets growth of *P. taeda*.

Key-words: Forest pathology. Forest seeds. Biological control. Microbiolization.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| RESUMO .....   | 2         |
| ABSTRACT .....   | 3         |
| LISTA DE FIGURAS .....   | 5         |
| 1. INTRODUÇÃO GERAL.....   | 11        |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....   | 13        |
| 2.1 <i>Pinus taeda</i> L.....  | 13        |
| 2.2 Qualidade sanitária de sementes florestais .....   | 15        |
| 2.3 Associação de <i>Fusarium</i> spp. com <i>Pinus</i> spp. e espécies florestais .....   | 18        |
| 2.4 Controle Biológico .....   | 19        |
| 2.4.1 O gênero <i>Trichoderma</i> .....  | 21        |
| <b>CAPÍTULO I - DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE <i>Fusarium</i> spp. EM SEMENTES DE <i>Pinus taeda</i> .....</b>                     | <b>23</b> |
| RESUMO .....   | 23        |
| ABSTRACT .....   | 24        |
| INTRODUÇÃO .....   | 25        |
| MATERIAL E MÉTODOS .....   | 27        |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 33        |
| CONCLUSÕES .....   | 47        |
| REFERENCIAS .....  | 48        |
| <b>CAPÍTULO II - MICROBIOLIZAÇÃO <i>in vitro</i> E <i>in vivo</i> DE SEMENTES DE <i>P. taeda</i> PARA CONTROLE DE <i>Fusarium</i> spp.....</b> | <b>55</b> |
| RESUMO .....   | 55        |
| ABSTRACT .....   | 56        |
| INTRODUÇÃO .....   | 57        |
| MATERIAL E MÉTODOS .....   | 59        |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 68        |
| CONCLUSÕES .....   | 90        |
| REFERÊNCIAS .....  | 92        |



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I - ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. COM SEMENTES DE *Pinus taeda*: DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE

**FIGURA 1.** Mudanças de *Pinus taeda* de seis meses de idade utilizadas no teste de patogenicidade.....32

**FIGURA 2.** Métodos de detecção de *Fusarium* spp. em *Pinus taeda*. Fase de instalação: A) Blotter test; B) Papel cartão; C) Meio seletivo. Fase de avaliação: D) Blotter test (7 dias); E) Papel cartão (14 dias); F) Meio seletivo (14 dias)..... 36

**FIGURA 3.** Morfologia das colônias de seis isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir do teste de detecção.....37

**FIGURA 4.** Teste de transmissão de *Fusarium* spp.: A) Plantio das sementes de *P. taeda* em vermiculita; B) Plântulas de *P. taeda* emergidas; C) Sinais de *Fusarium* spp. e de podridão em semente de *P. taeda*; D) Semente não germinada com *Fusarium* spp.....40

**FIGURA 5.** Escala descritiva para avaliação da severidade da podridão de raízes em mudas de *Pinus taeda* inoculadas com suspensão de conídios de *Fusarium* spp.....41

**FIGURA 6.** Teste de patogenicidade e agressividade de isolados de *F. subglutinans* spp. em mudas de *P. taeda*: A) Sintomas de descoloração das acículas, murcha e morte de mudas inoculadas com isolado L3R2, o mais agressivo de *F. subglutinans*.; B) Mudanças saudáveis do tratamento controle.....45

### CAPÍTULO II - MICROBIOLIZAÇÃO *in vitro* E *in vivo* DE SEMENTES DE *Pinus taeda* PARA CONTROLE DE *Fusarium* spp.

**FIGURA 1.** Teste de metabólitos não voláteis: A) Papel celofane sobreposto ao meio de cultura BDA; B) Retirada do celofane com a cultura de *Trichoderma* spp. aderente; C e D)

Transferência de disco de micélio de *Fusarium* spp. para o centro da placa de Petri.....63

**FIGURA 2.** Tratamento biológico e químico das sementes de *Pinus taeda*: A e B) Preparo da suspensão de conídios de *Trichoderma* spp. para microbiolização das sementes; C e D) Recobrimento, adição de água e agitação das sementes com fungicida tiofanato metílico + clorotalonil.....66

**FIGURA 3.** Teste de pareamento de culturas (*Trichoderma* x *Fusarium*): A) Pareamento do isolado TRB1 de *Trichoderma* spp. com o isolado TS2 de *Fusarium* spp.; B) Testemunha do isolado TS2; C) Pareamento do isolado TRB2 de *Trichoderma* spp. com o isolado TD2 de *Fusarium* spp.; D) Testemunha do isolado TD2.....71

**FIGURA 4.** Teste de metabólitos voláteis: A) Sobreposição das placas com o antagonista e o patógeno; B) Placas sobrepostas, a de baixo com disco de *Fusarium* spp. e em cima com disco de *Trichoderma* spp. C) Medição da colônia de *Fusarium* spp. com diâmetro reduzido pelo efeito dos metabólitos voláteis; D) Medição da colônia de *Fusarium* spp. não exposta aos metabólitos voláteis (testemunha).....74

**FIGURA 5.** Teste de microbiolização *in vitro* de sementes de *Pinus taeda*: A) Sementes de *P. taeda* tratadas com tiofanato metílico + clorotalonil; B) Sementes de *P. taeda* não tratadas; C e D) Sementes de *P. taeda* microbiolizadas com *Trichoderma* spp.....78

**FIGURA 6.** Sintomas da podridão de raiz em plântula de *Pinus taeda* causada por *Fusarium subglutinans*: A) Lesões no colo, murcha e morte da parte aérea; B) Lesão necrótica no hipocótilo; C) Lesão necrótica na radícula e sinais de *F. subglutinans*.....84

**FIGURA 7.** Sintomas de podridão de raiz e sinais de *Fusarium subglutinans* em plântulas de *Pinus taeda*: A) Podridão e murcha das acículas; B) Sinais de *F. subglutinans* nas acículas; C) Sinais de *F. subglutinans* na semente de *Pinus taeda*.....85

**FIGURA 8.** Altura média de plântulas de *Pinus taeda* do lote 3 de sementes (previamente inoculadas com *Fusarium subglutinans*.) em quatro tratamentos. <sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. \* Isolados de *Trichoderma* spp. \*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil.....90

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO I - ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. COM SEMENTES DE *Pinus taeda*: DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE**

**TABELA 1.** Lista dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir de sementes e raiz de *Pinus taeda*. Colombo, PR, 2012.....28

**TABELA 2.** Incidência média (%) de *Fusarium* spp. em sementes de seis lotes de *Pinus taeda* pelos três métodos de detecção: blotter test, papel cartão e meio seletivo (Colombo, PR/2012).....34

**TABELA 3.** Percentagem de plântulas emergidas (PE), sementes não germinadas (SNG) e SNG com *Fusarium* spp. de seis lotes de sementes de *Pinus taeda* (Colombo, PR/2012).....38

**TABELA 4.** Severidade e incidência da podridão de raiz em mudas de *Pinus taeda*, inoculadas com suspensão de conídios de seis isolados de *Fusarium* spp. (Colombo, PR/2012).....42

**TABELA 5.** Incidência, severidade média e AACPD de doze isolados de *Fusarium* spp. em mudas de *Pinus taeda* inoculadas com suspensões de  $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup> .....44

**TABELA 6.** Primeira contagem de germinação (%) e grau de umidade de seis lotes de sementes de *Pinus taeda*, antes do pré-esfriamento.....46

**TABELA 7.** Germinação (%) e grau de umidade de seis lotes de sementes de *Pinus taeda*.....46

### **CAPÍTULO II - MICROBIOLIZAÇÃO *in vitro* E *in vivo* DE SEMENTES DE *Pinus taeda* PARA CONTROLE DE *Fusarium* spp.**

|   |    |
|---|----|
| <b>TABELA 1.</b> Isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e de <i>Fusarium</i> spp. utilizados neste estudo.....   | 59 |
| <b>TABELA 2.</b> Crescimento micelial de <i>Fusarium</i> spp. (isolado TS2) em cultivo pareado com doze isolados de <i>Trichoderma</i> spp., percentagem de inibição do antagonista ao crescimento do patógeno e classificação dos isolados quanto ao antagonismo.....  | 69 |
| <b>TABELA 3.</b> Crescimento micelial de <i>Fusarium</i> spp. (isolado TD2) em cultivo pareado com doze isolados de <i>Trichoderma</i> spp., percentagem de inibição do antagonista ao crescimento do patógeno e classificação dos isolados quanto ao antagonismo.....  | 70 |
| <b>TABELA 4.</b> Percentagem de inibição do efeito de metabólitos voláteis de três isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento de três isolados de <i>Fusarium</i> spp.....   | 73 |
| <b>TABELA 5.</b> Percentagem de inibição do efeito de metabólitos não voláteis de três isolados de <i>Trichoderma</i> spp. sobre o crescimento de três isolados de <i>Fusarium</i> spp.....   | 76 |
| <b>TABELA 6.</b> Percentual da incidência média (%) de <i>Fusarium</i> spp. <i>in vitro</i> em três lotes de sementes de <i>Pinus taeda</i> sob tratamentos com <i>Trichoderma</i> spp. e fungicida.....  | 77 |
| <b>TABELA 7.</b> Velocidade de emergência de plântulas oriundas de sementes de <i>Pinus taeda</i> naturalmente infestadas com <i>Fusarium</i> e tratadas com <i>Trichoderma</i> spp. e tiofanato metílico + clorotalonil.....   | 80 |
| <b>TABELA 8.</b> Percentual de plântulas saudias, plântulas sintomáticas, plântulas sintomáticas com <i>Fusarium</i> , sementes não germinadas (SNG) tratadas com isolados de <i>Trichoderma</i> spp. e tiofanato metílico + clorotalonil, e SNG com <i>Fusarium</i> sob quatro tratamentos em três lotes de sementes de <i>Pinus taeda</i> ..... | 83 |

**TABELA 9.** Altura de plântulas (mm) de *Pinus taeda* sob quatro tratamentos em três lotes de sementes tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. e tiofanato metílico + clorotalonil.....86

**TABELA 10.** Incidência média de *Fusarium* spp. *in vitro* em sementes de *Pinus taeda* do lote 3 (inoculadas previamente com *Fusarium* spp.) e tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. e tiofanato metílico + clorotalonil.....87

**TABELA 11.** Velocidade de emergência de plântulas de *Pinus taeda* (cujas sementes foram inoculadas previamente com *Fusarium* spp.) do lote 3 aos 7, 14, 21, 28 dias após a semeadura.....88

**TABELA 12.** Percentual de plântulas sadias, plântulas sintomáticas, plântulas sintomáticas com *Fusarium* spp., sementes não germinadas (SNG) e SNG com *Fusarium* spp. sob quatro tratamentos em um lote de sementes (previamente inoculadas com *Fusarium* spp.) de *Pinus taeda*.....89

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui 7,0 milhões de hectares de florestas plantadas, dos quais 23,4% de plantios de *Pinus* spp.; 69,6% são de plantios de *Eucalyptus* spp.; e 7,0% com plantios de outras espécies florestais. Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF, 2012), a área plantada de *Pinus* no Brasil é de 1.641.892 ha e está concentrada principalmente na Região Sul (83%), devido às condições edafoclimáticas e à localização dos principais centros processadores desse tipo de madeira.

A qualidade das sementes é característica imprescindível para o sucesso de empreendimentos florestais, pois garante plantios uniformes e sucesso no desenvolvimento inicial da planta evitando a ocorrência de doenças. A qualidade sanitária das sementes pode ser afetada ainda no campo onde os patógenos podem ser transmitidos ou nas operações subsequentes – colheita, secagem e beneficiamento. Os patógenos prejudicam o processo de germinação das sementes ou, ainda, podem ocasionar possível tombamento em plântulas ou podridões no período de pós-emergência (CARNEIRO, 1986). Pode ocorrer disseminação destes patógenos para áreas ainda isentas e início de epidemias (PARISI et al., 2011).

Em seu trabalho pioneiro com sementes importadas de várias espécies de *Pinus*, Lasca et al. (1971) detectaram os gêneros fúngicos: *Pestalotia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Trichothecium*, *Alternaria*, *Diplodia*, *Botryodiplodia*, *Helminthosporium*, *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Neurospora* e *Penicillium*.

Espécies de *Fusarium* vêm sendo identificadas causando danos ao gênero *Pinus* no país (VENTURA, 1999), em sementes e plântulas, causando tombamento de mudas e plântulas (MENDES et al., 1998). Conforme Tint (1945) muitas espécies de *Fusarium*, em determinadas condições, podem causar redução na emergência, bem como mortalidade em pós-emergência de plântulas de *Pinus* spp., tais como: *F. avenaceum*, *F. moniliforme*, *F. orthoceros*, *F. poae*, *F. reticulatum*, *F. sambucinum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides* e *F. vasinfectum*. Hanioja (1969) também observou que espécies de *Fusarium*, principalmente *F. oxysporum*, provocaram tombamento de plântulas de *Pinus* em viveiros.

Homechin et al. (1986) constataram *F. moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. semitectum* em lotes de sementes do Paraná e Santa Catarina de *P. elliotti* var. *elliotti*, e *F. oxysporum* em sementes de *P. taeda*. *Fusarium sambucinum* foi associado às sementes de *Pinus elliotti* oriundas do Rio Grande do Sul sendo, também, transmitidos para plântulas causando anelamento do colo da plântula e podridão de parte aérea (Maciel, 2012). Esporos de

*Fusarium* podem estar presentes nas sementes, podendo, estes germinarem colonizarem as sementes e ocasionarem o tombamento das plântulas (HOMECHIN, 1986).

Além dos danos em sementes e tombamento de plântulas e mudas, a transmissão de *Fusarium* para as plântulas do gênero *Pinus* pode ser capaz de iniciar epidemias em campo, deixando de ter importância apenas na fase de viveiro. É o caso da espécie *Fusarium circinatum*, a qual tem sido introduzida em áreas de cultivo do seu hospedeiro *Pinus* sp., através de sementes, apresentando relatos de sua ocorrência em diversos países. O fungo *Fusarium circinatum*, além de causar podridão radicular e tombamento de plântulas, causa a doença chamada de Cancro Resinoso do Pinheiro em espécies de *Pinus* sp., representando uma séria ameaça às plantações desta espécie por reduzir o crescimento e qualidade da madeira, e poder causar a mortalidade de árvores (DWINNELL et al., 1977). Este patógeno foi relatado pela primeira vez na América do Norte (HEPTING et al., 1946), mas já se encontra atualmente no Japão (MURAMOTO et al., 1990), África do Sul (VILJOEN, 1994) México (GUERRA-SANTOS, 1999), Chile (WINGFIELD et al., 2002), norte da Espanha (LANDERAS et al., 2005; PÉREZ-SIERRA et al., 2007) e Itália (CARLUCCI et al., 2007).

*Fusarium* spp. pode estar localizado internamente, ou seja, o fungo está presente no tegumento e nos tecidos do gametófito e do embrião, comportando-se de modo endofítico na semente. Desta maneira *Fusarium* pode ser transmitido via sementes infectadas durante a germinação e formação de mudas, causando danos em pré-emergência destruindo as sementes ou em pós-emergência danificando as plântulas causando lesões no colo até destruir os tecidos provocando tombamento e morte da muda (CARNEIRO, 1987). Portanto, um método eficiente de detecção de fungos em sementes se faz necessário para evitar a disseminação de patógenos, bem como o estabelecimento de um tratamento de sementes.

A detecção de fungos associados às sementes pode ser feita por diferentes métodos sendo o mais comum o método papel filtro, mais conhecido como blotter test, meios de culturas como ágar-ágar e batata-dextrose-ágar (BDA) e meios seletivos ou semiseletivos (NEERGAARD, 1979; MAUDE, 1996; 1997; ALVAREZ; KANESHIRO, 1999). Particularmente, para sementes de pínus, Anderson et al. (1984) e Anderson (1986), descrevem um protocolo de detecção para *Fusarium subglutinans* baseado nos métodos do papel cartão e um meio seletivo preparado a base de ágar e o fungicida PCNB (pentacloronitrobenzeno) e outros produtos químicos.

O tratamento de sementes é uma prática que pode ser utilizada para eliminar os fitopatógenos das sementes florestais, tendo como objetivo a obtenção de mudas com boa



qualidade sanitária e silvicultural. Desta forma, as sementes tratadas estarão protegidas contra fitopatógenos associados às próprias sementes ou encontrados no solo, evitando também a disseminação de microrganismos patogênicos para áreas ainda isentas (PARISI et al., 2011).

Restrições ao uso de fungicidas e os cuidados com o meio ambiente reforçam a busca por alternativas viáveis (LUZ, 2001) e menos nocivas a natureza e à saúde humana, como os bioprotetores. A microbiolização de sementes constitui uma possibilidade de controle de patógenos com a vantagem de não ser poluente, além de contribuir com o controle mais estável da doença e tem se mostrado eficiente no controle de patógenos associados a elas, especialmente para culturas agrícolas (LUDWIG, 2009). Entretanto são necessários mais estudos para a extensão e aperfeiçoamento desta técnica para sementes de espécies florestais.

Face ao exposto, os objetivos do presente trabalho são: a) determinar o método mais apropriado para detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*; b) verificar a possível transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas; c) avaliar a patogenicidade e agressividade de *Fusarium subglutinans* em mudas; d) avaliar a eficiência do controle biológico *in vitro* e *in vivo* a base de *Trichoderma* spp.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Pinus taeda* L.

A madeira de *P. taeda*, no Brasil, é destinada ao processamento mecânico na produção de peças serradas para estruturas, fabricação de móveis, embalagens, molduras, chapas de diversos tipos e, também, à fabricação de celulose e papel (SHIMIZU, 2008). A cada ano aumenta a importância das florestas plantadas para a conservação do meio ambiente, pois ajudam a suprir a crescente demanda por madeira, lenha e carvão, minimizando os impactos nos recursos naturais. Segundo dados da pesquisa feita pelo IBGE sobre Extração Vegetal e Silvicultura, no ano de 2011 (IBGE, 2011), houve um aumento da produção de carvão vegetal extraído da silvicultura de 19,7% em relação a 2010. E a mesma pesquisa aponta que houve aumento de 7,6% da quantidade de lenha extraída da silvicultura. Em contrapartida, os principais produtos madeireiros da extração vegetal, o carvão e a lenha apresentaram decréscimo em suas produções (10,1% e 1,7%, respectivamente) quando comparados com as obtidas no ano anterior (IBGE, 2011). Tais quedas estão relacionadas à

atuação de órgãos fiscalizadores e ambientais, o que aponta uma tendência à importância crescente das florestas plantadas.

*Pinus taeda* L. pertence à família Pinaceae, sendo de origem norte americana. Dentre as gimnospermas, *Pinus* é um dos gêneros mais numerosos, reunindo cerca de 90 espécies. A família Pinaceae é detentora de um grande número de gêneros que possuem qualidade madeireira e a identificação das espécies de *Pinus* está ligada, principalmente, aos caracteres de suas folhas aciculares, cones e sementes (MARCHIORI, 1996). As acículas são longas e de coloração verde amarelada. Seus cones são de 7 a 15 cm de comprimento, oblongos e cilíndricos, abrindo-se quando maduros. As sementes apresentam cerca de 0,5 cm de comprimento, coloração marrom com marcas negras. *Pinus taeda* L. é popularmente conhecido como pinheiro-amarelo, pinheiro-rabo-de-raposa, pinheiro-do-banhado, pinos e pinho-americano (LORENZI et al., 2003). É uma espécie que pode atingir, em média, 25-35 metros de altura, podendo atingir até 50 m., possui tronco com casca marrom-avermelhada, fendida, com cristas escamosas. Sua propagação costuma ser por sementes devido a grande produção destas. *Pinus taeda* é uma espécie monoica, na qual os estróbilos masculinos se formam em grupos, nas extremidades dos ramos desenvolvidos no ano anterior, e os estróbilos femininos nos anos desenvolvidos no ano corrente. Os estróbilos masculinos se formam em grupos, na base de novas brotações na parte média e inferior da copa de árvores adultas (FERREIRA, 2005).

Sua distribuição natural abrange 14 Estados do Sul e Sudeste dos Estados Unidos, e estende-se desde o sul de Nova Jérsei até o centro da Flórida e, em direção ao oeste, até leste do Texas (FOWELLS, 1965). A cobertura florestal desta espécie é estimada em 11,7 milhões de ha (CUBBAGE e ARUNA, 1996). No Brasil, a partir de 1960, extensas áreas começaram a serem plantadas com *Pinus elliottii* e *Pinus taeda* (SHIMIZU e SEBBENN, 2008), nas regiões Sul e Sudeste, que englobam os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e Sul de São Paulo. O sucesso da implementação destas espécies nestes locais se deve aos fatores edafoclimáticos favoráveis ao desenvolvimento de *Pinus*.

A adaptação a solos ácidos, característicos na maioria dos solos dos planaltos do sul do Brasil, de acordo com KRONKA et al. (2005), permitiu a implantação de grandes áreas de reflorestamento com *P. taeda*, que, juntamente com o manejo adequado, tornou essa espécie uma importante fonte de matéria prima, estabelecida de acordo com padrões de sustentabilidade. Esta implementação de pinus no Brasil foi muito importante, pois era

necessário abastecer a indústria nacional com a produção de madeira serrada, madeira laminada para a confecção de painéis, produção de celulose e papel.

Com o aumento da demanda por madeira em consequência de maiores áreas de plantios, há necessidade de maior oferta de mudas e, conseqüentemente, o aumento da produção destas em viveiros, fato que pode favorecer o aparecimento de doenças causadas por fungos nestes ambientes. Os principais agentes causais de doenças são os fungos e estes atuam no início do desenvolvimento das mudas, causando danos em pré e pós-emergência, podendo ser transmitidos pelas sementes acarretando em perdas econômicas (CARNEIRO, 1986).

Portanto, as sementes devem ser oriundas de sistemas de produção baseados em material genético selecionado e devem ser devidamente armazenadas e beneficiadas a fim de se evitar a invasão de microrganismos nas sementes danificadas ou com alto teor de umidade ou baixa viabilidade. Estes podem ser os motivos do baixo rendimento da germinação de certos lotes de sementes (CARNEIRO, 1986).

## 2.2 QUALIDADE SANITÁRIA DE SEMENTES FLORESTAIS

O sucesso na implantação de empreendimentos florestais necessita de sementes que tenham uma boa qualidade. A epidemia de muitas doenças pode ter início com inóculo contido na semente, além de ser este um dos veículos mais importantes de transmissão de fitopatógenos. As sementes, como unidades propagativas da maioria das espécies florestais comerciais, têm como fator limitante sua condição fitossanitária (SOAVE e WETZEL, 1987).

Devido à procura de sementes florestais para reflorestamentos com fins preservacionistas ou não, o intercâmbio de sementes entre regiões tem sido ampliado nos últimos anos e poderá constituir-se em um meio de movimentação inevitável de patógenos. Isto, porque as sementes podem carregar, na sua superfície ou internamente, fungos e outros organismos (RAHALKAR; NEERGAARD, 1969), constituindo-se principal via de disseminação e de acesso de patógenos de plantas. Para muitos patógenos conhecidos, as sementes significam um meio quase exclusivo de sobrevivência, podendo ser levados a longas distâncias, inserindo novos patógenos em áreas não contaminadas até então (MACHADO, 1988)

Muitos são os fatores responsáveis por afetar a qualidade das sementes, são eles: fatores genéticos, fatores fisiológicos, fatores físicos e fatores sanitários (ABEAS, 1998). A

presença de fungos pode reduzir a capacidade germinativa de um lote de sementes, podendo apresentar problemas na interpretação dos resultados dos testes de germinação diminuindo a oferta destas (CASTELLANI et al., 1996). Considerando que determinadas espécies florestais apresentam ciclicidade quanto a sua produção e oferta de sementes, sua análise sanitária é imprescindível para o conhecimento dos agentes e as consequências decorrentes da contaminação por microrganismos (KAGEYAMA, 1985; CASTELLANI et al., 1996).

As sementes são contaminadas por diversos patógenos no campo e nas operações subsequentes-colheita, secagem e beneficiamento, o que afeta a sua qualidade, reduz a sua capacidade germinativa, bem como causa tombamento de plântulas e podridões (CARNEIRO, 1987). Segundo Wetzel (1987), longos períodos de armazenamento podem ser uma condição favorável ao desenvolvimento de fungos. No estudo da viabilidade e sanidade de sementes florestais, Netto e Faiad (1995) observaram que as mesmas são portadoras de grande variedade fúngica e que, portanto, torna-se importante conhecer a sanidade de sementes para a formação de mudas de qualidade em viveiro, caso contrário estas poderão originar plântulas doentes ou disseminar microrganismos para áreas ainda não infestadas (CARNEIRO, 1986).

A maioria dos patógenos transmitidos por sementes não pode ser detectada por inspeção visual destas, podendo estar contaminadas por esporos (JACCOUD FILHO e DABUL, 2011). A detecção de fungos associados às sementes pode ser feita por diferentes métodos sendo o mais comum o método papel filtro, mais conhecido como blotter test, meios de culturas como ágar-ágar e batata-dextrose-ágar (BDA) e meios seletivos ou semiseletivos (NEERGAARD, 1979; MAUDE, 1996; 1997; ALVAREZ; KANESHIRO, 1999). Particularmente, para sementes de pínus, Anderson et al. (1984) e Anderson (1986), descrevem um protocolo de detecção para *Fusarium subglutinans* baseado nos métodos do papel cartão e um meio seletivo preparado a base de ágar e o fungicida PCNB (pentacloronitrobenzeno) e outros produtos químicos.

Na literatura mundial, vários fungos já foram relatados em sementes de espécies florestais. Os gêneros mais comumente relatados encontram-se o *Aspergillus*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Trichoderma* (MITTAR, 1981;1986; SANTOS et al., 2011). Estudos das condições sanitárias de sementes e espécies florestais no Brasil são bastante recentes (SALES, 1992; CORRÊA, 1995). E os poucos trabalhos existentes apenas relacionam os micro-organismos que ocorrem nas sementes, sem verificar seus efeitos na germinação e desenvolvimento das plantas (SOAVE; WHETZEL, 1987; CARNEIRO, 1990).

Em 1986, Mucci & Lasca deram início a um levantamento dos fungos associados às sementes de espécies florestais colhidas pelo Instituto Florestal de São Paulo. Foram analisadas sementes de *Cassia leptophylla*, *Cedrela fissilis*, *Peltophorum dubium*, *Tabebuia* sp., *Myroxylon balsamum*, *Anadenathera macrocarpa*, *Dalbergia nigra* e *Cassia ferruginosa*. Foram detectados nestas espécies os seguintes gêneros fúngicos: *Alternaria*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Pestalotia*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Trichothecium*, *Pithomyces*, *Epicoccum*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Dreschlera*, *Graphium*, *Peyronella*, *Nigrospora* e *Periconia*.

Gêneros potencialmente patogênicos já foram relatados em associação com as sementes florestais, são eles: *Alternaria*, *Ascochyta*, *Botryodiplodia*, *Botrytis*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Diplodia*, *Dreschlera*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Macrophoma*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Phomopsis*, *Rhizoctonia*, *Septoria* e *Verticillium* (GRIGOLETTI JÚNIOR; AUER, 2000; SANTOS et al., 2011). Diversos gêneros de fungos saprófitas também foram descritos: *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Epicoccum*, *Monilia*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Periconia*, *Rhizopus* e *Trichoderma*. Estes fungos são conhecidos como fungos de armazenamento.

O primeiro trabalho realizado em sementes de *Pinus* spp. a fim de se verificar as condições fitossanitárias foi realizado por Lasca et al. (1971). Os autores detectaram diversos gêneros fúngicos: *Pestalotia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Trichothecium*, *Alternaria*, *Diplodia*, *Botryodiplodia*, *Helminthosporium*, *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Neurospora* e *Penicillium*.

Em *Pinus taeda*, Carneiro (1986) relatou diversos gêneros associados às sementes, são eles: *Fusarium*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Botryodiplodia*, *Pestalotia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Verticillium*, *Chaetomium* e *Epicoccum*.

Em outras espécies florestais já foram relatadas doenças relacionadas a fungos transmitidos por sementes durante a fase de formação de mudas: Tombamento de mudas de acácia-negra (*Acacia mearnsii*) provocado por *Fusarium* sp.; Danos provocados por *Rhizoctonia* sp. em mudas de bracatinga (*Mimosa scabrella*); Tombamento em plântulas de cedro (*Cedrella fissilis*) provocado por *Fusarium* sp. (SANTOS e PARISI, 2011). Os mesmos autores, também destacam, além do tombamento e a podridão de raízes, lesões em folhas, cotilédones e caules em plântulas de pata-de-vaca (*Bauhinia fortificata*).

### 2.3 ASSOCIAÇÃO DE *Fusarium* spp. COM *Pinus* spp. E ESPÉCIES FLORESTAIS

Há poucos relatos na literatura descrevendo a associação de *Fusarium* spp. com sementes de *Pinus* spp. Homechin et al. (1986) detectou *Fusarium oxysporum* em teste de sanidade realizado com sementes de *P. taeda*. Maciel (2012) relatou associação de *Fusarium sambucinum* com sementes de *Pinus elliotii*. Os principais problemas causados por fungos do gênero *Fusarium* ocorrem durante a fase de germinação e produção de mudas (SANTOS et al., 2000; CARNEIRO, 1987).

*Fusarium* sp. foi relatado como potencial fitopatogênico a espécie florestal barbatimão (*Strphnodendron adstringens*) impedindo o desenvolvimento de plântulas, apodrecendo completamente os cotilédones e a radícula (SALES, 1992). Carneiro (1990) analisou a qualidade sanitária de onze espécies florestais e constatou a presença de *Fusarium* sp. nas seguintes espécies: peroba amarela (*Aspidosperma ramiflorum*), aroeira (*Astronium urundeuva*), angico-do-campo (*Piptadenia macrocarpa*), algaroba (*Prosopis juliflora*), carvoeiro (*Sclerolobium paniculatum*) e ipê-amarelo (*Tabebuia serratifolia*). Em sementes de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*) também foi encontrado *Fusarium* sp. (SANTOS et al., 2000). Lazarotto et al. (2012) verificaram que *Fusarium* sp. foi transmitido via semente para plântulas de cedro (*Cedrella fissilis*). Também foi relatada associação de *Fusarium* sp. em sementes de baguaçu por Rego et al. (2008). *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum* foram relatados por Poletto et al. (2011) como espécies patogênicas a erva-marte causando podridão de raízes em condições de viveiro e a campo.

Os esporos dos fungos podem ser encapsulados durante a formação das sementes de pínus, permanecendo dormentes até a germinação causando o tombamento das mudas (AUER, 1993). Os fungos causadores do tombamento de mudas, incluindo *Fusarium*, destroem os tecidos tenros e suculentos das plântulas durante a germinação levando-os à morte. Se o ataque do fungo acontecer no período de pré-emergência, ocorre o apodrecimento das sementes ou morte das plântulas. Ataques no período após a emergência resultam em lesões necróticas no hipocótilo ou nas radículas, podendo lesionar também o epicótilo, cotilédones e gema apical. O tombamento da planta decorre do rápido desenvolvimento das lesões no colo, seguido de murcha e morte da parte aérea. Sinais do patógeno ainda podem surgir sobre os tecidos lesionados e plântulas mortas.

## 2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O uso indiscriminado de agrotóxicos para controle de pragas e doenças na agricultura tem provocado diversos problemas no cenário ambiental, como a contaminação de alimentos, do solo, da água, dos animais, bem como a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos (BETTIOL e MORANDI, 2009). Isto provoca um desequilíbrio biológico, pois afeta diretamente a biodiversidade de espécies com a eliminação de organismos benéficos, alterando a ciclagem de nutrientes e de matéria orgânica (BETTIOL e MORANDI, 2009). Há a necessidade de um manejo adequado dos recursos naturais a fim de evitar a degradação do meio ambiente. Este enfoque altera as prioridades do sistema convencional de agricultura em relação à redução da dependência por produtos químicos, insumos energéticos e maiores usos de processos biológicos nos sistemas agrícolas (BETTIOL e GINNI, 2003).

Frente a este cenário, a sociedade tem mostrado preocupação com estes impactos negativos na agricultura, resultando em um mercado de alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos ou aqueles que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente. Dentre as alternativas ao uso de agrotóxicos, o controle biológico se destaca, sendo um dos mais discutidos, sendo, uma das técnicas a introdução de um agente de controle biológico. Para testar se há ação antagônica de um agente de controle biológico, é necessário que se façam testes *in vitro* e *in vivo* para confirmar o potencial antagonista e os mecanismos inerentes aos agentes de biocontrole, bem como os efeitos ecológicos que interferem no controle da doença (LUMSDEN e LOCKE, 1989).

Uma das técnicas de controle biológico que pode ser empregada é a microbiolização de sementes cujo princípio consiste no revestimento de sua superfície com microrganismos vivos previamente a sementeira. É considerado um método adequado de introdução de bioprotetores para controle de patógenos em sementes, formando uma primeira barreira de defesa das plantas contra o ataque de microrganismos fitopatogênicos (LUZ, 1993).

Esta técnica vem sendo empregada principalmente no controle de patógenos causadores de podridões de sementes, tombamentos, podridões radiculares e morte de plântulas (LUZ, 1991a). Geralmente a microbiolização de sementes proporciona melhor controle da podridão das sementes, do tombamento e da morte das plântulas do que proteção prolongada das podridões radiculares (LUZ, 1993). Os principais gêneros fúngicos transmitidos via sementes em diversas culturas como *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*,

*Sclerotinia*, *Pythium* e *Macrophomina*, são controlados eficientemente através da técnica de microbiolização de sementes (CARVALHO e NAGAWAVA, 2000).

O revestimento das sementes com microrganismos tem vários objetivos: fixar o N<sub>2</sub>; melhorar a absorção de nutrientes; controlar os patógenos das sementes; controlar os patógenos que sobrevivem no solo e causam podridões das sementes, morte das plântulas e tombamento; proteger as partes subterrâneas das plantas contra os patógenos que habitam o solo e causam podridões radiculares; melhorar a taxa de germinação e o vigor das sementes; promover o crescimento das plantas e aumentar o rendimento das plantas (LUZ, 1993).

Sementes de feijão microbiolizadas com biocontroladores a base de isolados de *Pseudomonas veronii*, *Bacillus* spp., *Bacillus cereus*, *Rodhococcus fascians* e *Pseudomonas fluorescens*, proporcionaram menores taxas de transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* para as plântulas de feijão, além de aumentos de massa foliar e radicular (CORRÊA et al., 2008). A microbiolização de sementes de milho com o isolado T-22 de *Trichoderma harzianum* melhorou significativamente a emergência e o rendimento dos grãos de milho (LUZ, 2001). Efeitos semelhantes ocorreram quando sementes de algodão foram tratadas com *T. harzianum*, pois estas apresentaram percentagens de germinação e emergência mais elevadas em relação às sementes quimicamente tratadas com flutolanil (FARIA et al., 2003). Isolados CEN281, CEN1070 e CEN1080 de *Trichoderma* spp., utilizados na microbiolização de sementes de tomate, controlaram eficientemente o tombamento de plântulas de tomate causada por *Sclerotium rolfsii* (MONTALVÃO, 2012). O tratamento de sementes de *Pinus elliottii* com *Bacillus subtilis* e *Trichoderma* spp. demonstrou eficiência na promoção da germinação (MACIEL, 2012). O produto comercial Rizolyptus®, a base de *B. subtilis*, se mostrou promissor no biocontrole de *Fusarium sambucinum*, proporcionando maior vigor às plântulas, reduzindo as perdas ocasionadas pelo patógeno (MACIEL, 2012).

As principais vantagens desta técnica residem nas características dos microrganismos utilizados. Os agentes biocontroladores são supostamente biodegradáveis, evitando, até o momento, efeitos deletérios ao meio ambiente; tendem a se multiplicar no solo por serem organismos vivos beneficiando a flora microbiana presente no substrato por um longo período; apresentam menor custo de pesquisa e desenvolvimento dos protetores comparado aos produtos químicos. Entretanto, podem demandar maior tempo para exercer o controle quando comparados aos controladores químicos e, ainda, podem ser susceptíveis a mutações genéticas, fato que requer estudos mais específicos (MICHEREFF, 2001).



Dentre os agentes conhecidos de controle biológico, estão os fungos do gênero *Trichoderma*. Os principais gêneros fúngicos antagonistas utilizados para microbiolização de sementes são: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Aspergillus* e *Chaetomium* (SILVA, et al., 2008). O trabalho pioneiro que descreveu um isolado de *Trichoderma* sp. como agente de biocontrole foi publicado por Weindling e Fawcett (1936) que trabalharam no controle de doença em citros provocada por *Rhizoctonia solani*.

#### 2.4.1 O gênero *Trichoderma*

Este gênero é amplamente distribuído pelo mundo, ocorrendo em quase todos os tipos de solo e ambientes naturais, especialmente aqueles ricos em matéria orgânica, podendo algumas espécies ser encontrados em rizosferas de plantas. Espécies de *Trichoderma* possuem a capacidade de se desenvolver em vários substratos, fato que justifica a importância biotecnológica atribuída a estes fungos (EPOSITO e SILVA, 1998).

As espécies do gênero *Trichoderma* são consideradas antagonistas naturais a diversos fitopatógenos de solo, tais como: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, entre outros. Podem diminuir ou eliminar, desta forma, o uso de fungicidas atuando como agentes de controle biológico (MELO, 1991; HARMAN, 2000).

São vários os mecanismos de ação de *Trichoderma*, tais como parasitismo, antibiose, competição, indução de resistência e promoção do crescimento vegetal. O parasitismo consiste em uma relação nutricional entre os hospedeiros, no qual o parasita obtém nutrientes do hospedeiro. Já o hiperparasitismo ocorre quando o hospedeiro também é um parasita. Este caso designa a ação de *Trichoderma*, pois este é capaz de detectar e localizar hifas crescendo em sua direção, provavelmente por estímulos químicos, realizado pela célula hospedeira, enrolando-se fortemente em sua extensão para então penetrar e digerir a hifa (MELO, 1998).

A antibiose decorre em função de metabólitos voláteis ou não voláteis produzidos por *Trichoderma* cujo efeito danifica o organismo hospedeiro (BETTIOL, 2000). Enquanto que, a competição é um processo que integra dois ou mais organismos empenhados em uma mesma ação e dependem de fatores idênticos para sobrevivência. Geralmente, esta competição ocorre por nutrientes, entretanto pode ocorrer por oxigênio e por espaço. Muitos organismos fitopatogênicos são sensíveis à escassez de alguns nutrientes, portanto a competição por nutrientes é um mecanismo importante (BENITEZ, et al., 2004).

Segundo Harman (2000), *Trichoderma* compete com o fitopatógeno pelo exsudato que é liberado pelas sementes durante a germinação. Estes exsudatos auxiliam a germinação e desenvolvimento do fitopatógeno, portanto com a presença de *Trichoderma* o crescimento do patógeno é afetado. *Trichoderma* também pode causar indução de resistência em plantas pelo fato deste agente antagonista ser capaz de aumentar a atividade de certas enzimas produzidas pelas plantas tais como quitinases, glutanases e peroxidases. Estas enzimas estão envolvidas nas rotas de percepção da planta a presença do patógeno a locais distantes onde o sítio de infecção foi gerado (ROMEIRO, 2007). Em paralelo, verifica-se um aumento nas atividades destas enzimas que estão envolvidas na síntese de componentes de resistência (HWANG; BENSON, 2002; SNEH; ICHIELEVICH-AUSTER, 1998).

Algumas espécies de *Trichoderma* também são hábeis em promover o crescimento vegetal. A princípio foi designada a esta capacidade o fato de *Trichoderma* exercer controle a fitopatógeno prejudiciais presentes no solo. Entretanto, na ausência destes, o crescimento vegetal é decorrente da indução a produção de hormônios ou outros fatores de crescimento, além de maior disponibilidade e eficiência na absorção de alguns nutrientes pela planta (LUCON, 2009). Alguns isolados de *Trichoderma* spp. também podem atuar como bioestimulantes do crescimento radicular de algumas plantas através de fitohormônios melhorando a utilização de nutrientes pela planta, fato que aumenta a resistência da planta diante de situações de estresse (HARMAN, 2000).

## CAPÍTULO I - DETECÇÃO, TRANSMISSÃO E PATOGENICIDADE DE *Fusarium* spp. EM SEMENTES DE *Pinus taeda*

**RESUMO** - A podridão de raiz (PR) em *Pinus taeda*, causada por *Fusarium* spp., ocasiona perdas de plântulas no viveiro em função da vulnerabilidade de suas sementes em relação a sua qualidade fitossanitária. As mudas doentes caracterizam-se inicialmente pela descoloração das acículas para tom verde-amarelado seguida de curvatura apical, murcha e consequente morte da muda. Os objetivos deste trabalho foram: a) determinar o método mais adequado e eficiente para detecção de *Fusarium* spp. nas sementes de *P. taeda*; b) verificar se há transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas de *P. taeda*; c) desenvolver uma escala descritiva para avaliar a severidade da PR em mudas de *P. taeda*; d) avaliar a patogenicidade, agressividade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de isolados de *Fusarium subglutinans*. Para detecção foram aplicados três tratamentos em seis lotes de sementes de *P. taeda* sendo quatro repetições de 25 sementes: Blotter Test, Papel Cartão e Meio Seletivo. A transmissão foi avaliada em sementes de seis lotes de *P. taeda* durante dois meses contabilizando a percentagem de plântulas emergidas (PE), sementes não germinadas (SNG) e de SNG com *Fusarium* spp. Cada um dos seis lotes foi considerado um tratamento e este dividido em quatro repetições de 25 sementes de *P. taeda*. Uma escala descritiva de notas foi desenvolvida para avaliar a severidade de PR em mudas de *P. taeda*, avaliando-se a severidade e a incidência da doença aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. Foi avaliada a patogenicidade, a severidade e a incidência de doze isolados de *F. subglutinans* obtidos no teste de detecção aos 14, 28, 42 e 56 dias após a inoculação das mudas. A AACPD foi mensurada a partir da obtenção dos dados da severidade. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado para todos os testes, sendo três e seis tratamentos respectivamente e quatro repetições de 25 sementes de *P. taeda* para os testes de detecção e transmissão. Para o teste de patogenicidade e agressividade foram 13 tratamentos com 15 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e quando significativos pelo teste F ( $p < 0,05$ ), foram comparados ao teste Tukey a 5%. Concluiu-se que: a) o método de detecção mais sensível ao detectar *Fusarium* spp. em sementes de *P. taeda* foi o meio seletivo; b) Não houve transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas de *P. taeda*, no entanto *Fusarium* spp. causou apodrecimento de sementes na fase de germinação; c) a escala descritiva permitiu a avaliação da progressão dos sintomas da doença PR em mudas de *P. taeda*; d) Nove isolados de *F. subglutinans* se mostraram patogênicos a mudas de *P. taeda*, reproduzindo sintomas típicos da PR, sendo o isolado L3R2 o mais agressivo e o que exibiu maior AACPD.

**Palavras-chave:** patologia florestal, espécie florestal, patologia de semente, sementes florestais.

## DETECTION, TRANSMISSION AND PATHOGENICITY OF *Fusarium* spp IN *Pinus taeda* SEEDS

**ABSTRACT** - The root rots (RR) in *Pinus taeda*, caused by the *Fusarium* spp., causes loss of seedling in the vivarium because of its seeds' vulnerability in relation to its phytosanitaria quality. At the beginning the sick seedlings are characterized by discoloration of the needles to a yellowish-green tone followed by apical curvature, wilt and the consequent death of the seedling. The objectives of this work were to: a) define the method more appropriate and efficient to detect *Fusarium* spp. in *P. taeda*'s seeds; b) verify if there is transmission of *Fusarium* spp. from seeds to *P. taeda*'s seedlings; c) develop a descriptive scale to evaluate the severity of the RR in *P. taeda*'s seedlings; d) evaluate the pathogenicity, aggressiveness and area under the disease progress curve (AUDPC) of isolated *Fusarium subglutinans*. For detection three treatments were applied to six lots of *P. taeda*'s seeds, being four repetitions of 25 seeds: Blotter Test, Paper Card and Selective Medium. The transmission was evaluated in seeds from six lots of *P. taeda* during two months counting the percentage of emerged plantlet (EP), non-germinated seeds (NGS) and from NGS seeds with *Fusarium* spp. For each one of the six lots was considered one treatment and this divided in four repetitions of 25 seeds of *P. taeda*. A descriptive scale of grades was developed to evaluate the severity of RR in *P. taeda*'s seedlings, assessing the severity and the incidence of the illness at 7, 14, 21 and 28 days after the inoculation from *P. taeda*'s seedlings. The pathogenicity, severity and incidence of twelve isolated *Fusarium subglutinans* obtained in the detection test at 14, 28, 42 and 56 days after inoculation of the seedlings were evaluated. A completely randomized design for all tests was utilized, consisting of three and six treatments respectively and four replications of 25 seeds of *P. taeda* tests for detection and transmission. To test for pathogenicity and aggressiveness 13 treatments with 15 replications were applied. The data were submitted to variance analysis and when they were significant by the F test ( $p < 0,05$ ), they were compared to Tukey test at 5%. It was concluded that: a) the detection method most sensitive to detect *Fusarium* spp. on *P. taeda*'s seeds was the Ágar; b) there were no transmission *Fusarium* spp. seeds to seedlings *P. taeda*, however *Fusarium* spp. caused a seed during germination; c) the descriptive scale allowed evaluating the progression of RR symptoms on *P. taeda*'s seedlings; d) Nine isolated of *F. subglutinans* were found to be pathogenic to *P. taeda*'s seedlings, reproducing typical symptoms of RR, being isolated L3R2, the most aggressive.

**Key-words:** forest pathology, forest species, seed's pathology, forest seeds

## INTRODUÇÃO

*Pinus taeda* L. é nativo dos Estados Unidos da América, sendo que sua distribuição compreende 14 estados americanos e a cobertura florestal com esta espécie chega a 11,7 milhões de ha (CUBBAGE et al., 1996). Trata-se de uma espécie exótica no Brasil, entretanto é cultivada em extensas áreas, principalmente na Região Sul e Sudeste, incluindo as partes serranas do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, bem como as partes mais chuvosas do sul dos estados de São Paulo e Minas Gerais (CONSTANTINO, 2009).

A área plantada de pínus no Brasil é de 1.641.892 ha e está concentrada principalmente na região Sul do país, devido as condições edafoclimáticas e à localização dos principais centros processadores desse tipo de madeira. A região Sul detem 83% da área de plantios florestais com pínus. O estado do Paraná lidera o ranking da área plantada de pínus com 40,1% da área total, seguido por Santa Catarina e Rio Grande do Sul que possuem 32,8 e 10% respectivamente (ABRAF, 2012). O consumo de madeira em tora de pínus para uso industrial, considerando todos os segmentos, foi de 49,8 milhões de m<sup>3</sup> no ano de 2011 (ABRAF, 2012). A indústria madeireira foi o segmento de maior consumo de madeira em tora de pínus, com 54,78 % seguidas dos segmentos de celulose e papel com 16,27%, painéis de madeira industrializada com 15,56% e lenha industrial com 12,81% (ABRAF, 2012).

Dada a importância para o setor florestal da produção de madeira de *P. taeda*, a demanda por mudas vem progredindo e, com isso, os problemas fitossanitários, nos viveiros onde são produzidas as mudas, têm sido ampliados. Portanto, o conhecimento da qualidade de sementes torna-se importante para a formação de mudas de qualidade em viveiro, caso contrário estas poderão originar plântulas doentes ou disseminar microrganismos para áreas ainda não infestadas (CARNEIRO, 1986; SANTOS et al., 2011). Poucas pesquisas já relataram a associação de *Fusarium* spp. a sementes de *P. taeda* (LASCA et al., 1971; CARNEIRO, 1986; HOMECHIN, 1986).

A principal doença que ocorre em viveiros de pínus é o tombamento de mudas que pode ser causada por diversos gêneros fúngicos, tais como *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Cylindrocladium*, *Phytophthora* e *Pytium* (AUER et al., 2001). O ataque destes patógenos ocorre durante a fase de germinação, destruindo as plântulas. Além do tombamento de mudas, as podridões de raízes podem ocorrer (AUER et al., 2001). Em trabalho realizado por GRIGOLETTI JUNIOR et al. (2006), mudas de *P. taeda* inoculadas com *Fusarium* spp. apresentaram sintomas a partir dos 10 dias após a inoculação. Na parte aérea ocorreu redução

do crescimento da muda descoloração das acículas para um tom verde-amarelado, seguida de murcha. Em seguida, a parte apical da muda começou a secar e curvar-se para baixo, provocando murcha e conseqüente morte. No sistema radicular, ocorreu redução no desenvolvimento e necrose das raízes atacadas, quando comparadas com raízes de plantas saudáveis.

A maioria dos patógenos transmitidos por sementes não pode ser detectada por inspeção visual destas, podendo estar contaminadas por esporos (JACCOUD FILHO e DABUL, 2011). A detecção de fungos associados às sementes pode ser feita por diferentes métodos sendo o mais comum o método papel filtro, mais conhecido como blotter test, meios de culturas como ágar-ágar e batata-dextrose-ágar (BDA) e meios seletivos ou semiseletivos (NEERGAARD, 1979; MAUDE, 1996; 1997; ALVAREZ; KANESHIRO, 1999). Particularmente para sementes de pínus, Anderson et al. (1984) e Anderson (1986), descrevem um protocolo de detecção para *Fusarium subglutinans* baseado nos métodos do papel cartão e um meio seletivo preparado a base de ágar e o fungicida PCNB (pentacloronitrobenzeno) e outros produtos químicos.

As fontes primárias de inóculo da doença podem ser as sementes, o solo ou substratos, a água de irrigação, as instalações e os materiais contaminados (estufas, tubetes). A fonte secundária é constituída por esporos produzidos em material doente, disseminados pelo vento, pelos respingos de água, pelo manuseio das mudas ou pelo contato entre as mesmas. A doença poderá se agravar quando houver excesso de água, sombreamento e adubação nitrogenada para as plântulas (AUER et al., 2001). A quantificação de doenças pode ser feita a partir da utilização de chaves descritivas. Estas chaves utilizam escalas arbitrárias com certo número de graus para quantificar doenças. Cada grau da escala deve ser apropriadamente descrito ou definido. É fundamental que o estágio de desenvolvimento da planta seja bem definido (AMORIM, 1995).

Devido a falta de informações sobre o patossistema *Pinus taeda* x *Fusarium* spp., em relação a associação do fitopatógeno às sementes, o presente trabalho teve como objetivos: a) avaliar o método mais adequado e eficiente para detecção de *Fusarium* spp. nas sementes de *P. taeda*; b) verificar se há transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas de *P. taeda*; c) desenvolver uma escala descritiva para avaliar a severidade da PR em mudas de *P. taeda*; d) avaliar a patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram desenvolvidos quatro experimentos nos Laboratórios de Patologia Florestal e Sementes Florestais e em casa de vegetação da Embrapa Florestas, Colombo – Paraná, no período de junho de 2011 a outubro de 2012.

### **Origem do material vegetal**

As sementes dos seis lotes de *P. taeda*, denominados lote 1, lote 2, lote 3, lote 4, lote 5 e lote 11, procedentes do município de Arapoti-PR, foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas, Colombo – Paraná.

As mudas de *Pinus taeda* foram provenientes do viveiro comercial localizado no município de Guarapuava, estado do Paraná. As mudas estavam com seis meses de idade e com altura de aproximadamente 15 a 20 cm e encontravam-se em tubetes de polietileno preto. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente.

### **Isolamento e preservação de *Fusarium* spp.**

Os isolados de *Fusarium* foram obtidos a partir do isolamento de raízes de mudas doentes de *P. taeda* que apresentavam sintomas de podridão de raízes e também de sementes de *P. taeda*. As raízes foram cortadas em pedaços de aproximadamente 0,5 cm, com estilete esterilizado em câmara de fluxo, e, rapidamente, imersos em álcool 70 % e depois mergulhados por 30 segundos em solução de hipoclorito de sódio 1 %. Em seguida, os fragmentos de raiz foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura BDA suplementado com cloranfenicol (40 ppm) e ampicilina (80 ppm). As placas de Petri foram incubadas em câmaras BOD a 24 °C durante sete dias e as colônias de *Fusarium* foram repicadas para novas placas com meio de cultura a fim de se obter culturas puras. Os isolados obtidos foram preservados por meio de repicagens periódicas em meio BDA em tubos de ensaios.

Sementes de seis lotes de *P. taeda* foram incubadas sob três metodologias descritas no experimento I: blotter test, papel cartão e meio seletivo. Após a incubação destas sementes, foi realizado isolamento a partir de culturas de *Fusarium* spp. que se encontravam sobre as sementes de *P. taeda*. Para cada lote de sementes avaliado, foram obtidos dois isolados de

*Fusarium* spp., totalizando doze isolados. Estes isolados de foram identificados no Laboratório de Fitopatologia na Universidade Estadual de Maringá. Os doze isolados foram identificados como *Fusarium subglutinans* cujos teleomorfos se agrupam no complexo *Gibberella fujikuroi* (Tabela 1). Em pesquisa realizada por Maciel (2012), a espécie do isolado de *Fusarium* sp. associado à *Pinus elliottii* foi identificada como *Fusarium sambucinum*.

A descrição de todos os isolados utilizados obtidos a partir do experimento I (sementes de *P. taeda*) e aqueles utilizados para a elaboração da escala descritiva (raiz de *P. taeda* e coleção Embrapa-Florestas) encontra-se na Tabela 1.

**TABELA 1.** Lista dos isolados de *Fusarium* spp. obtidos a partir de sementes e raiz de *Pinus taeda*. Colombo, PR, 2012.

| Isolado (código) | Origem                          | Espécie                        |
|------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| L1R1             | Semente <i>P. taeda</i> lote 1  | <i>Fusarium subglutinans</i> * |
| L1R3             | Semente <i>P. taeda</i> lote 1  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L2R2             | Semente <i>P. taeda</i> lote 2  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L2R3             | Semente <i>P. taeda</i> lote 2  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L3R2             | Semente <i>P. taeda</i> lote 3  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L3R3             | Semente <i>P. taeda</i> lote 3  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L4R1             | Semente <i>P. taeda</i> lote 4  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L4R4             | Semente <i>P. taeda</i> lote 4  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L5R1             | Semente <i>P. taeda</i> lote 5  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L5R3             | Semente <i>P. taeda</i> lote 5  | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L11R1            | Semente <i>P. taeda</i> lote 11 | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| L11R2            | Semente <i>P. taeda</i> lote 11 | <i>Fusarium subglutinans</i>   |
| 04 06            | Coleção Embrapa-Florestas       | <i>Fusarium</i> sp.            |
| 05 06            | Coleção Embrapa-Florestas       | <i>Fusarium</i> sp.            |
| T3C              | Raíz <i>P. taeda</i>            | <i>Fusarium</i> sp.            |
| TD1              | Raíz <i>P. taeda</i>            | <i>Fusarium</i> sp.            |
| TD2              | Raíz <i>P. taeda</i>            | <i>Fusarium</i> sp.            |

\* Identificação: Dr. Dauri José Tessmann - Universidade Estadual de Maringá - UEM

### Métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*

Para a detecção de *Fusarium* spp. em sementes de seis lotes de *Pinus taeda*, foram utilizados três diferentes métodos: blotter test (BT), papel cartão (PC) e meio seletivo (MS). O



protocolo de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de pínus utilizado neste experimento foi baseado em trabalhos de Anderson et al. (1984), Anderson (1986) e Santos et al. (2011) com algumas modificações.

### **Blotter test (BT)**

As sementes de *P. taeda* não desinfestadas, foram esmagadas com auxílio de um bastão de vidro esterilizado e acomodadas em caixas gerbox forradas com papel filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. As sementes foram incubadas a 20°C durante sete dias.

### **Papel cartão (PC)**

Foi preparado um caldo nutritivo (15 g de peptona, 5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1 g de  $KH_2PO_4$ , 1 g de PCNB (pentacloronitrobenzeno) em 1000 mL de água destilada) e vertido sobre uma folha de papel cartão de cor azul e esterilizado, em quantidade suficiente para saturar a folha de papel (ANDERSON, 1986). O papel cartão de cor azul umedecido com o caldo nutritivo foi colocado em caixas gerbox, previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1 %. As sementes de pínus não desinfestadas foram, individualmente, esmagadas sobre uma superfície de vidro esterilizado com um bastão esterilizado. Posteriormente, as sementes foram colocadas sobre o papel cartão umedecido com o caldo nutritivo. As caixas gerbox foram incubadas a 20 °C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 h, por 14 dias.

### **Meio seletivo (MS)**

Este método implica no uso de um meio seletivo para *Fusarium*, preparado com 15 g de peptona, 5 g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 1 g de  $KH_2PO_4$ , 1 g de PCNB (pentacloronitrobenzeno) e 20 g de ágar em 1000 mL de água destilada (ANDERSON, 1986). O meio foi suplementado com soluções de cloranfenicol (40 ppm) e ampicilina (40 ppm) antes de ser vertido em placas de Petri. As sementes de pínus não desinfestadas foram esmagadas com bastão esterilizado e colocadas sobre a superfície do meio seletivo. As placas de Petri foram incubadas a 20 °C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 h por 14 dias.

As avaliações dos três métodos foram realizadas observando-se as colônias fúngicas crescidas sobre as sementes com auxílio de microscópio estereoscópio e, quando necessário, foi realizado preparo de lâminas, para observação em microscópio óptico e através da ilustração encontrada em Barnett e Hunter (1998) foi realizada a identificação.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo três tratamentos com quatro repetições cada, totalizando 100 sementes/tratamento.

### **Transmissão de *Fusarium* spp. de sementes para plântulas de pinus**

Foram utilizadas bandejas de polietileno com 200 células, devidamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1 %, para a semeadura das sementes de *P. taeda* em vermiculita para cada um dos seis lotes avaliados. As sementes de *P. taeda* receberam pré-tratamento durante 28 dias a 5 °C em câmara fria para quebra de dormência. As sementes não desinfestadas foram semeadas em vermiculita Plantmax®. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação e irrigadas diariamente.

Avaliou-se semanalmente, durante 60 dias, a percentagem de plântulas emergidas. As sementes que não germinaram foram resgatadas ao final do experimento e colocadas em blotter test e incubadas a 25 °C durante sete dias. Após este período, as sementes foram avaliadas com auxílio de microscópio estereoscópio e, quando necessário, lâminas foram preparadas para identificação de estruturas fúngicas para observação em microscópio óptico. Quantificou-se o número de sementes de cada lote que apresentaram colônias de *Fusarium* spp.,

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por lote. Os valores da percentagem de plântulas emergidas, sementes não germinadas e sementes não germinadas com *Fusarium* spp. foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.6 beta (2012).

## **Escala descritiva para avaliar a severidade da podridão de raízes (PR) em mudas de *Pinus taeda***

A elaboração da escala foi realizada mediante a observação dos sintomas da doença PR no viveiro, baseado no trabalho de Grigoletti Junior e Auer (2006). Os critérios para a elaboração das notas da escala descritiva foi estabelecido com base em observações em viveiro sobre a evolução da doença e as consequentes alterações sofridas pela planta no decorrer do desenvolvimento da doença.

Para elaboração da escala descritiva, 60 mudas de *P. taeda* foram inoculadas nas raízes pelo método da imersão. Foi preparada uma suspensão de  $10^6$  conídios.  $\text{mL}^{-1}$  de cinco isolados de *Fusarium* spp. potencialmente fitopatogênicos, são eles: 0406, 0506, T3C, TD1 e TD2 (Tabela 1). As raízes foram previamente cortadas antes de sua imersão em suspensão por 30 minutos. A severidade da doença foi avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados com seis tratamentos, sendo cinco isolados de *Fusarium* spp. e mais a testemunha, com dez repetições de uma muda cada.

### **Teste de patogenicidade e de agressividade dos isolados de *Fusarium* spp. encontrados no teste de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*.**

No teste de patogenicidade foram utilizados doze isolados de fungos do gênero *Fusarium* potencialmente fitopatogênicos encontrados nos seis lotes de pinus nos testes de detecção (meio seletivo, blotter test e papel cartão) os quais foram isolados em meio batata-dextrose-água (BDA) com ampicilina (80 ppm) e cloranfenicol (40 ppm) e mantidos em tubos de ensaio com BDA até o seu uso. Para a produção de inóculo, os fungos foram crescidos em BDA com ampicilina (80 ppm) e cloranfenicol (40 ppm), a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , por doze dias.

Raízes de mudas de *P. taeda* (Figura 1) com seis meses de idade foram imersas em suspensão de  $10^6$  conídios.  $\text{mL}^{-1}$  de cada um dos 12 isolados de *Fusarium* spp. As raízes foram devidamente cortadas em aproximadamente dois centímetros na parte apical e permaneceram mergulhadas durante 30 minutos. Após este período, as mudas foram plantadas em vasos plásticos contendo vermiculita.

Foram realizadas quatro avaliações, aos 14, 28, 42 e 56 dias após a inoculação contabilizando a severidade média, utilizando-se a escala descritiva de notas, e a incidência da doença. A partir dos dados de severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da

doença (AACPD) (CAMPBELL; MADDEN, 1990), baseado na fórmula:  $AACPD = \sum(y_i + y_{i+1}) * (t_{i+1} - t_i)$ , onde  $i$  = número de avaliações;  $y$  = severidade de *Fusarium subglutinans*;  $t$  = tempo (dias). Os valores da severidade média aos 56 dias e da AACPD foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.6 beta (2012).

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 13 tratamentos (12 isolados de *Fusarium subglutinans* mais a testemunha) e 15 repetições de uma muda cada.



**FIGURA 1.** Mudanças de *Pinus taeda* com seis meses de idade utilizadas no teste de patogenicidade.

## **Qualidade fisiológica das sementes de *Pinus taeda***

### **Determinação do grau de umidade (%)**

Para a determinação da umidade relativa das sementes de *P. taeda*, foram utilizadas duas repetições de 5 g de sementes as quais foram colocadas em estufa regulada com temperatura a 105 °C por 24 horas. A superação de dormência das sementes foi realizada por pré-tratamento, em câmara fria a 5 °C por 21 dias. Os resultados foram expressos em percentagem com base no peso úmido das sementes, conforme as regras para análise de sementes (RAS) (BRASIL, 2009).

### **Primeira Contagem de Germinação e Germinação**

Para o teste de germinação foram utilizados quatro repetições de 100 sementes dos seis lotes. As sementes foram semeadas em caixas de acrílico tipo gerbox contendo papel mata-borrão umedecido. Os gerbox foram colocados em câmara de germinação tipo B.O.D a 20 °C por oito horas sem luz e 30 °C por 16 horas com luz. A contagem inicial do número de sementes germinadas foi realizada após sete dias da semeadura, e a contagem final realizada após 28 dias da semeadura. Foram realizados dois testes de germinação: antes e após o pré-esfriamento, de acordo com normas estabelecidas pela RAS (BRASIL, 2009). As variáveis analisadas foram: percentagem de plântulas normais, plântulas anormais, sementes duras, sementes dormentes e sementes mortas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda***

Foi detectado *Fusarium* spp. em sementes de *P. taeda* a partir dos métodos BT, PC e MS. Os resultados da avaliação dos métodos de detecção encontram-se na Tabela 2 e Figura 2. Foram observados diferentes aspectos morfológicos das colônias de seis isolados de *Fusarium* (L11R1, L2R3, L5R2, L4R1, L1R1 e L3R2) identificados como *Fusarium subglutinans* que podem ser observadas na Figura 3.

Na maioria dos seis lotes de sementes, o método MS foi superior aos demais, exceto no lote 2 cujos métodos não diferiram entre si na detecção de *Fusarium* spp. No lote 5, os métodos de PC e MS não diferiram entre si, todavia, estes dois métodos foram superiores ao BT (Tabela 2).

Nos lotes 1 e 3, os métodos BT e PC não diferiram entre si na detecção *Fusarium* spp. sendo menos sensíveis do que o método MS. Entretanto, o mesmo não foi observado nos lotes 4 e 11, cujos três tratamentos diferiram entre si. No lote 4 foi observada a maior desigualdade entre os tratamentos, pois o método MS apresentou 94% de incidência de *Fusarium* spp. nas sementes, enquanto que os métodos BT e PC apresentaram incidências de 33 e 7%, respectivamente (Tabela 2).

**TABELA 2.** Incidência média (%) de *Fusarium* spp. em sementes de seis lotes de *Pinus taeda* pelos três métodos de detecção: blotter test, papel cartão e meio seletivo (Colombo, PR/2012).

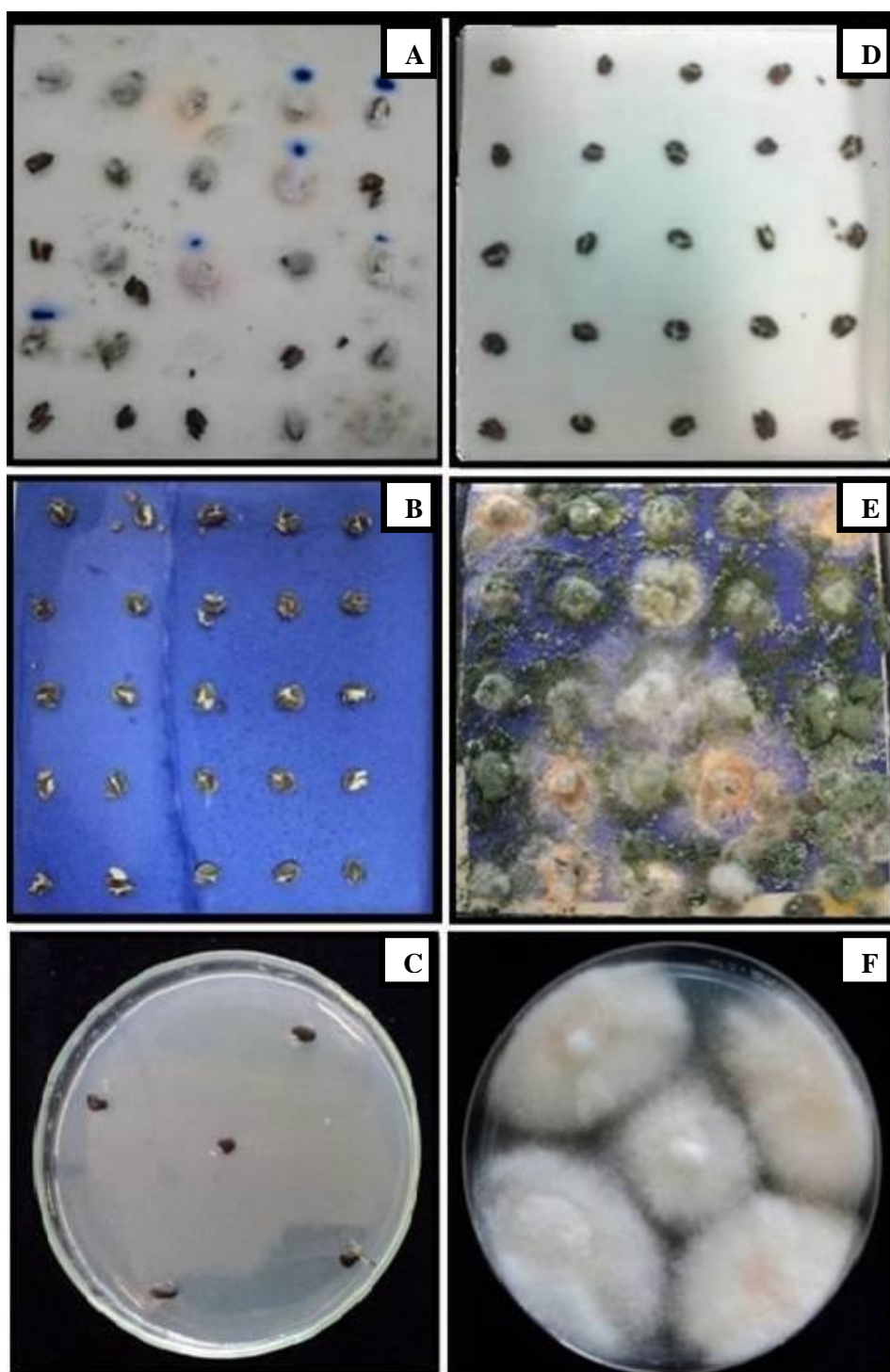
| Tratamento         | Incidência média de <i>Fusarium</i> (%) |        |        |        |        |         |
|--------------------|---|--------|--------|--------|--------|---------|
|                    | Lote 1                                  | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 | Lote 11 |
| Blotter Test (BT)  | 13 a <sup>1</sup>                       | 7a     | 4a     | 33b    | 10a    | 5a      |
| Papel Cartão (PC)  | 16 a                                    | 12a    | 11a    | 7a     | 30b    | 26b     |
| Meio Seletivo (MS) | 67 b                                    | 16 a   | 34 b   | 94c    | 39b    | 48c     |

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

O método MS foi o método que apresentou maior sensibilidade para a detecção de *Fusarium* spp., em sementes de *Pinus taeda*, quando comparado aos outros métodos testados (blotter test e papel cartão). As diferenças visuais entre os métodos de detecção podem ser observadas na Figura 2. Em pesquisa realizada por Anderson (1986) foi testado dois métodos de detecção (similares aos métodos PC e MS estudados neste trabalho) de *Fusarium subglutinans* em três lotes de sementes com diferentes incidências de *F. subglutinans*. Foram constatadas frequências de *F. subglutinans* similares entre os três lotes de sementes avaliados e entre os dois métodos, dado que corrobora com o resultado observado no lote 5 deste trabalho. Em outros estudos com sementes florestais, os métodos de detecção blotter test e batata-dextrose-água (BDA) foram igualmente eficientes em detectar *Fusarium* em sementes de cedro (RUIZ FILHO et al., 2004; BENETTI et al., 2009) e em sementes de paineira (LAZAROTTO et al., 2010).

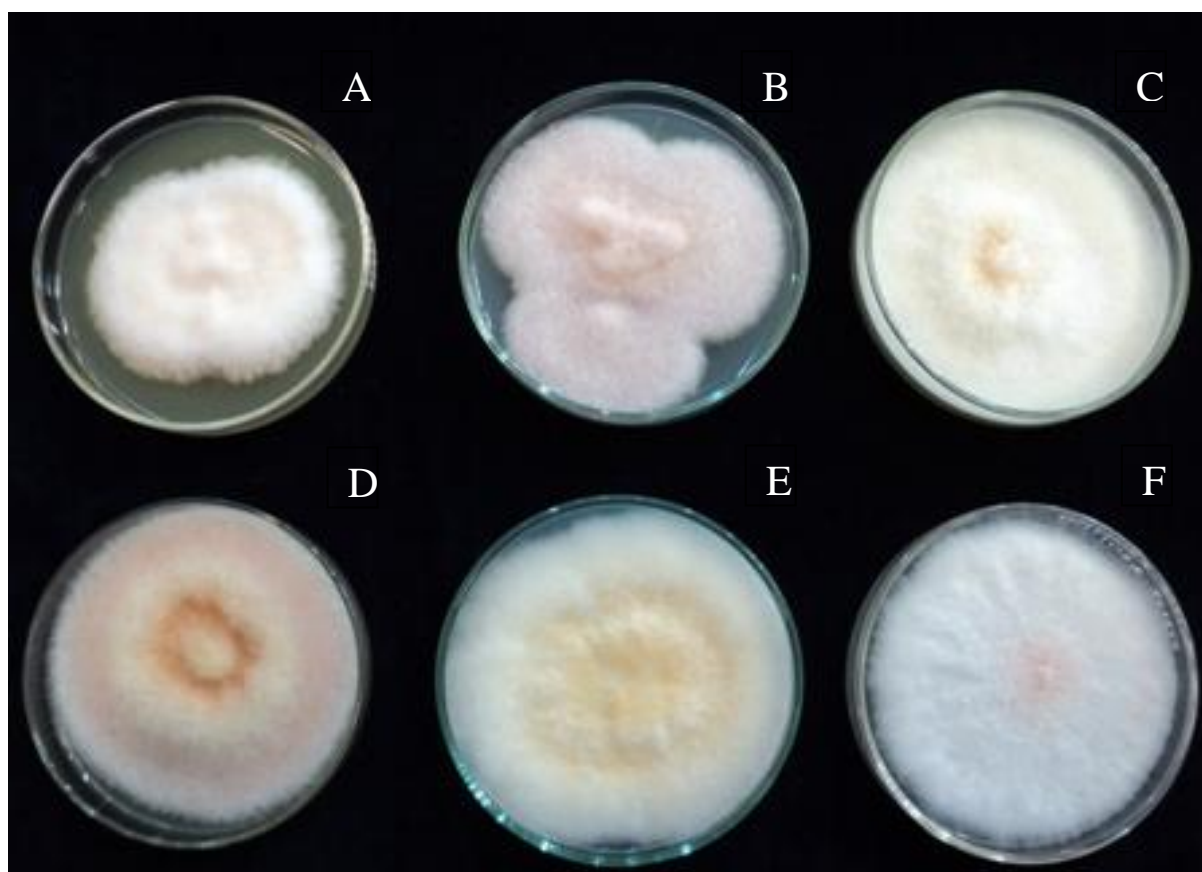
As diferenças observadas neste trabalho entre a eficiência dos métodos de detecção de *Fusarium* spp. podem ser explicadas pela presença de produtos químicos e do fungicida pentacloronitrobenzeno (PCNB). O PCNB, presente no meio seletivo utilizado para os métodos MS e PC, restringe o crescimento micelial de outros gêneros fúngicos, permitindo o crescimento micelial de *Fusarium*.





**FIGURA 2.** Métodos de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda*: Fase de instalação: A) Blotter test; B) Papel cartão; C) Meio seletivo. Fase de avaliação: D) Blotter test (7 dias); E) Papel cartão (14 dias); F) Meio seletivo (14 dias).





**FIGURA 3.** Morfologia das colônias de seis isolados de *Fusarium subglutinans*. obtidos a partir do teste de detecção: A) L11R1; B) L2R3; C) L5R2; D) L4R1; E) L1R1; F) L3R2.

Em estudo realizado por Martins (2005) com isolados de *Fusarium* spp. obtidos em cacau, soja e tomate foi observada variabilidade na coloração das colônias (branca, verde, amarela, rosa e roxa), dado que ratifica o constatado no presente trabalho.

#### **Transmissão de *Fusarium* spp. de sementes para plântulas de *P. taeda***

Não houve transmissão de *Fusarium* spp. de sementes para as plântulas. Porém, a incidência de *Fusarium* spp. nas sementes afetou seu desenvolvimento no período de germinação. Os resultados da avaliação da transmissão de *Fusarium* de sementes para as plântulas de *P. taeda* encontram-se na Tabela 3 e Figura 4.

As sementes dos seis lotes utilizadas neste experimento apresentaram diferenças significativas na porcentagem de plântulas emergidas (PE) e de sementes não germinadas (SNG) (Tabela 3). O teste de germinação realizado com a amostragem de sementes de cada lote mostrou diferenças na qualidade fisiológica entre eles (Tabelas 6 e 7). Portanto, é

possível afirmar que esta diferença significativa na percentagem de PE e de SNG possa ser atribuída à variação da qualidade fisiológica entre os lotes de sementes.

Não se verificou plântulas sintomáticas em PE, enquanto que as SNG apresentaram incidências de *Fusarium* spp. que variaram em mais de 21 % (lote 2) a quase 37 % (lote 1) evidenciando a presença de *Fusarium* spp. nas sementes, impedindo a germinação destas (Figura 4). Entretanto, esta incidência do fungo nas SNG não variou significativamente entre os lotes, evidenciando a importância da qualidade fisiológica, além da qualidade sanitária, na germinação da semente (Tabela 3).

**TABELA 3.** Percentagem de plântulas emergidas (PE), sementes não germinadas (SNG) e SNG com *Fusarium* spp. de seis lotes de sementes de *Pinus taeda* (Colombo, PR/2012).

|         | Plântulas Emergidas (%) | Sementes não- germinadas(%) | SNG com Fusarium (%) |
|---------|-------------------------|-----------------------------|----------------------|
| Lote 1  | 43 c*                   | 57 b                        | 36,84 a              |
| Lote 2  | 39 c                    | 61 b                        | 21,31 a              |
| Lote 3  | 77 a                    | 23 d                        | 26,09 a              |
| Lote 4  | 17 d                    | 83 a                        | 30,12 a              |
| Lote 5  | 33 c                    | 67 b                        | 34,33 a              |
| Lote 11 | 57 b                    | 43 c                        | 32,56 a              |
| CV%     | 11,74                   | 9,35                        | 41,35                |

\*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade

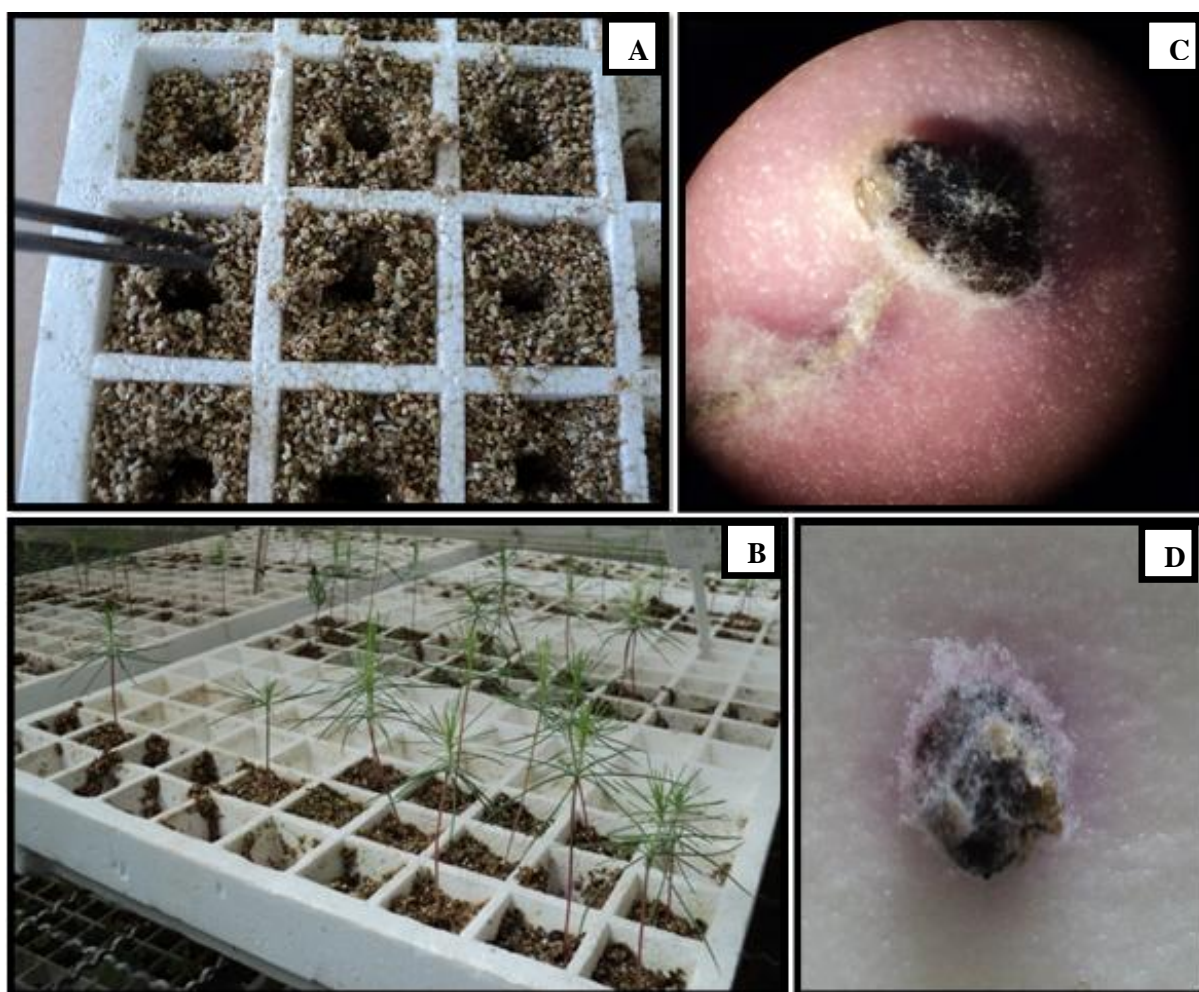
Apesar de não ter sido verificada a transmissão neste experimento, à mesma foi observada em experimentos subsequentes a este. No capítulo II foram utilizadas as mesmas sementes que neste experimento e estas originaram plântulas que exibiram sintomas e foi constatada a presença de *Fusarium*, evidenciando que houve a transmissão de *Fusarium* das sementes para as plântulas. Houve uma percentagem de plântulas sintomáticas que variou de 2,36 a 3,59 % considerando os lotes de sementes de baixa, média e alta incidência de *Fusarium*. Estes dados estão descritos na Tabela 8 do capítulo II.

De acordo com os dados obtidos, neste trabalho, não é possível afirmar que houve transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas. Porém, é possível afirmar que houve efeito deletério na fase de germinação, uma vez que em todos os lotes pode-se atribuir a não germinação das sementes em mais de 21 % em consequência da presença de *Fusarium* spp. Esta constatação ratifica o observado por Carneiro (1987) que afirma que *Fusarium* pode ser transmitido via sementes infectadas durante a germinação causando danos em pré-emergência destruindo as sementes. Nesta pesquisa não foram observadas lesões em plântulas

no período de pós-emergência, todavia vários estudos relatam a transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas. Mendes et al. (2005) constataram a presença de 27,5% de *Fusarium solani* em sementes não germinadas de sabiá (*Mimosa caesalpiniaefolia* Benth.).

Outros estudos em sementes florestais confirmaram a transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas. Lazarotto et al. (2010) demonstraram a transmissão de *Fusarium* spp. das sementes de paineira para as plântulas. Lazarotto et al. (2012) relataram que houve transmissão de *Fusarium* spp. em sementes de *Cedrela fissilis* causando danos nas raízes e posterior tombamento. Em sementes de *Pinus eliottii* foi confirmada transmissão de *Fusarium sambucinum* das sementes para as plântulas, e foram constatados sintomas de apodrecimento da parte aérea (MACIEL, 2012).

Em culturas agrícolas, diversos trabalhos confirmaram a transmissão de diferentes espécies de *Fusarium* das sementes para plântulas, tais como: Sartori et al. (2004) em sementes de milho (*Zea mays*), confirmaram transmissão de *Fusarium moniliforme*; Balardin et al. (2005) constataram a transmissão de *Fusarium solani* f.sp. *glycines*, agente causal da podridão-vermelha da raiz de soja (*Glycine max*), através da semente desta espécie; Santos et al. (1996), verificaram a transmissão efetiva de *Fusarium oxysporum* via sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*), sendo que este estava presente em 14 % das sementes e obteve uma alta percentagem de transmissão (42,8 %).



**FIGURA 4.** Teste de transmissão de *Fusarium* spp.: A) Plantio das sementes de *P. taeda* em vermiculita; B) Plântulas de *P. taeda* emergidas; C) Sinais de *Fusarium* spp. e de podridão em semente de *P. taeda*; D) Semente não germinada com *Fusarium* spp.

#### **Escala descritiva para avaliar a severidade da podridão de raízes (PR) em mudas de *Pinus taeda***

Na Tabela 4 são apresentados os resultados dos sintomas e das respectivas notas referentes à escala descritiva da doença aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação e plantio das mudas.

A escala descritiva desenvolvida para avaliação da severidade da PR em mudas de *P. taeda* encontra-se na Figura 5. As plantas de *P. taeda* inoculadas com *Fusarium* spp. apresentaram descoloração das acículas, murcha com leve curvatura apical, seguido de murcha total ocasionando a morte da planta. Além dos sintomas de parte aérea, foi observado uma estagnação no crescimento radicular. Os mesmos sintomas foram relatados por Grigoletti

Junior e Auer (2006). Com base nesses sintomas observados no viveiro, foi possível desenvolver uma escala descritiva com três notas: 0- planta sem sintomas; 1- planta com as acículas descoloridas; 2- planta murcha com leve curvatura apical; 3- planta morta.



| NOTA | Descrição dos Sintomas                    |
|------|---|
| 0    | Planta sadia                              |
| 1    | Planta com as acículas descoloradas       |
| 2    | Planta com leve curvatura apical e murcha |
| 3    | Planta Morta                              |

**FIGURA 5.** Escala descritiva para avaliação da severidade da podridão de raízes em mudas de *Pinus taeda* inoculadas com suspensão de conídios de *Fusarium* spp.

Os isolados de *Fusarium* spp. apresentaram valores de incidências distintas ao longo das avaliações. O isolado 0406, inicialmente aos sete dias após a inoculação, apresentou maior incidência com 40 % das plantas exibindo sintomas, seguido do isolado 0506 com 30 %. Os isolados TD1 e TD2 apresentaram incidência intermediária da doença com 10 e 20 % respectivamente (Tabela 4). As plantas inoculadas com o isolado T3C não exibiram sintomas. Em trabalho realizado com diferentes isolados de *Fusarium* spp., foi relatado que o isolado endofítico Cac19.4 obtido em plantas de cacau, além de não causar nenhum sintoma em plantas de soja e tomate, ainda promoveu o crescimento vegetal, aumentando o peso da raiz e caule de plântulas de soja e tomate (MARTINS, 2005).

Os isolados 0406 e 0506 foram os que causaram maior severidade média da PR às plantas de *P. taeda* aos 14 dias após a inoculação destas em relação aos demais isolados, apresentando nota média igual a 1,00. Ao final das avaliações, as plantas inoculadas com o isolado 0506 apresentaram maior incidência e severidade de *Fusarium*, com valores iguais a 90% e 2,70, respectivamente. Os outros dois isolados TD1 e TD2 que se mostraram patogênicos às plantas de *P. taeda*, apresentaram menor agressividade, uma vez que a nota da severidade média variou entre 0,90 e 1,50, respectivamente, ao final das avaliações (Tabela 4).

**TABELA 4.** Severidade média e incidência da podridão de raiz em mudas de *Pinus taeda*, inoculadas com suspensão de conídios de seis isolados de *Fusarium* spp. (Colombo, PR/2012).

| DAI <sup>1</sup> | Tratamentos | Severidade (Nota) <sup>2</sup> | Incidência (%) |
|------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| 7                | 04 06       | 0,60 <sup>3</sup>              | 40             |
|                  | 05 06       | 0,53                           | 30             |
|                  | T3C         | 0,00                           | 0              |
|                  | TD1         | 0,20                           | 10             |
|                  | TD2         | 0,30                           | 20             |
| 14               | 04 06       | 1,00                           | 40             |
|                  | 05 06       | 1,00                           | 40             |
|                  | T3C         | 0,00                           | 0              |
|                  | TD1         | 0,40                           | 20             |
|                  | TD2         | 0,69                           | 30             |
| 21               | 04 06       | 1,40                           | 50             |
|                  | 05 06       | 1,10                           | 40             |
|                  | T3C         | 0,00                           | 0              |
|                  | TD1         | 1,20                           | 50             |
|                  | TD2         | 0,81                           | 30             |
| 28               | 04 06       | 2,03                           | 70             |
|                  | 05 06       | 2,70                           | 90             |
|                  | T3C         | 0,00                           | 0              |
|                  | TD1         | 1,50                           | 60             |
|                  | TD2         | 0,90                           | 30             |

<sup>1</sup> DAI: dias após a inoculação

<sup>2</sup> Escala descritiva: 0 - planta sem sintomas; 1 - planta com as acículas descoloridas; 2 - planta com leve curvatura apical e murcha; e 3 - planta morta

<sup>3</sup> Valor da severidade média de um total de 10 plantas avaliadas



## **Teste de patogenicidade e agressividade dos isolados de *Fusarium* spp. encontrados no teste de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda***

Os valores da severidade e incidência média e a AACPD dos isolados de *Fusarium subglutinans* nas mudas de *P. taeda* inoculadas com o fitopatógeno estão descritos na Tabela 5. Os sintomas observados nas mudas encontram-se na Figura 6.

No teste de patogenicidade e agressividade, em que foram avaliados sintomas da podridão de raiz, apenas três dos doze isolados de *Fusarium* spp. não se mostraram patogênicos a mudas de *P. taeda*, são eles: L4R1, L5R1 e L11R1 (Tabela 5). Os demais provocaram sintomas típicos da doença, todavia os isolados apresentaram agressividades desiguais visto que a severidade média entre eles variou.

O isolado que exibiu maior valor de severidade média, ao final dos 56 dias após a inoculação, foi o L3R2 de *F. subglutinans*, apresentando 1,67 de severidade. Os valores da AACPD dos isolados foram baseados nos dados de severidade média considerando o progresso da doença ao longo do tempo, considerando o início até o final das avaliações. O valor de AACPD do isolado L3R2 foi de 21,16, diferindo estatisticamente dos demais isolados de *F. subglutinans*, sendo, portanto, o mais agressivo. Outro isolado que se destacou dentre os demais foi o isolado L2R2, cujo valor da AACPD foi de 10,73. Este isolado foi o que apresentou maior incidência média de podridão de raiz nas mudas, com o valor de 80% (Tabela 5).

Os isolados menos agressivos foram os isolados L1R1, L1R3, L3R3, L4R4 e L5R3, cujos valores da AACPD variaram entre 2,33 a 4,67, não diferindo significativamente entre si. E os isolados que apresentaram agressividade intermediária foram os isolados L2R3 e L11R2, com valores de AACPD de 7,00 e 7,16 respectivamente (Tabela 5). A desigualdade na agressividade entre os isolados pode ser explicada, além dos valores da severidade, pela variação dos valores da incidência da doença que oscilou entre 20% (isolado L5R3) e 80% (isolado L2R2) (Tabela5).

Em trabalho realizado por Grigoletti et al. (2006), cerca de 60% das mudas que tiveram suas raízes imersas em suspensão de  $10^6$  conídios  $\text{mL}^{-1}$  de *Fusarium* spp. reproduziram sintomas típicos da doença podridão de raízes, comprovando a patogenicidade de fungos do gênero *Fusarium* em mudas de *P. taeda*, dados que corroboram com os obtidos neste estudo. Homechin et al. (1986) constataram a patogenicidade de *Fusarium moniliforme*

em plântulas de *Pinus eliotti*, uma vez que este patógeno causou sintomas necróticos no colo e nas raízes.

No presente trabalho foram constatados sintomas como secamento da parte apical das acículas (descoloração das acículas), leve curvatura apical e murcha, necrose, escurecimento das raízes e estagnação do crescimento das raízes, os mesmos encontrados por Grigoletti et al. (2006).

**TABELA 5.** Incidência, severidade média e AACPD de doze isolados de *Fusarium* spp. em mudas de *Pinus taeda* inoculadas com suspensões de  $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>.

| Isolado    | Dias de Avaliação após a Inoculação |                         |            |            |            |            |                      |            | AACPD <sup>4</sup> |
|------------|-------------------------------------|-------------------------|------------|------------|------------|------------|----------------------|------------|--------------------|
|            | 14                                  |                         | 28         |            | 42         |            | 56                   |            |                    |
|            | Severidade <sup>1</sup>             | Incidência <sup>2</sup> | Severidade | Incidência | Severidade | Incidência | Severidade           | Incidência |                    |
| L1R1       | 0,13                                | 13,33                   | 0,33       | 33,33      | 0,33       | 33,33      | 0,33 bc <sup>3</sup> | 33,33      | 4,20 c             |
| L1R3       | 0,13                                | 13,33                   | 0,33       | 33,33      | 0,40       | 40,00      | 0,40 bc              | 40,00      | 4,67 c             |
| L2R2       | 0,40                                | 33,33                   | 0,73       | 66,67      | 0,87       | 66,67      | 1,00 ab              | 80,00      | 10,73 b            |
| L2R3       | 0,20                                | 20,00                   | 0,33       | 33,33      | 0,60       | 60,00      | 0,93 ab              | 73,33      | 7,00 bc            |
| L3R2       | 1,13                                | 60,00                   | 1,53       | 73,33      | 1,60       | 73,33      | 1,67 a               | 73,33      | 21,16 a            |
| L3R3       | 0,00                                | 0,00                    | 0,00       | 0,00       | 0,33       | 13,33      | 0,33 bc              | 13,33      | 2,33 c             |
| L4R1       | 0,00                                | 0,00                    | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00                 | 0,00       | 0,00               |
| L4R4       | 0,13                                | 13,33                   | 0,27       | 26,67      | 0,27       | 26,67      | 0,27 bc              | 26,67      | 3,42 c             |
| L5R1       | 0,00                                | 0,00                    | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00                 | 0,00       | 0,00               |
| L5R3       | 0,00                                | 0,00                    | 0,20       | 13,33      | 0,53       | 20,00      | 0,53 bc              | 20,00      | 4,67 c             |
| L11R1      | 0,00                                | 0,00                    | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00                 | 0,00       | 0,00               |
| L11R2      | 0,33                                | 33,33                   | 0,47       | 46,67      | 0,60       | 60,00      | 0,60 bc              | 60,00      | 7,16 bc            |
| Testemunha | 0,00                                | 0,00                    | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00       | 0,00                 | 0,00       | 0,00               |
| CV (%)     |                                     |                         |            |            |            |            |                      | 46,54      | 28,92              |

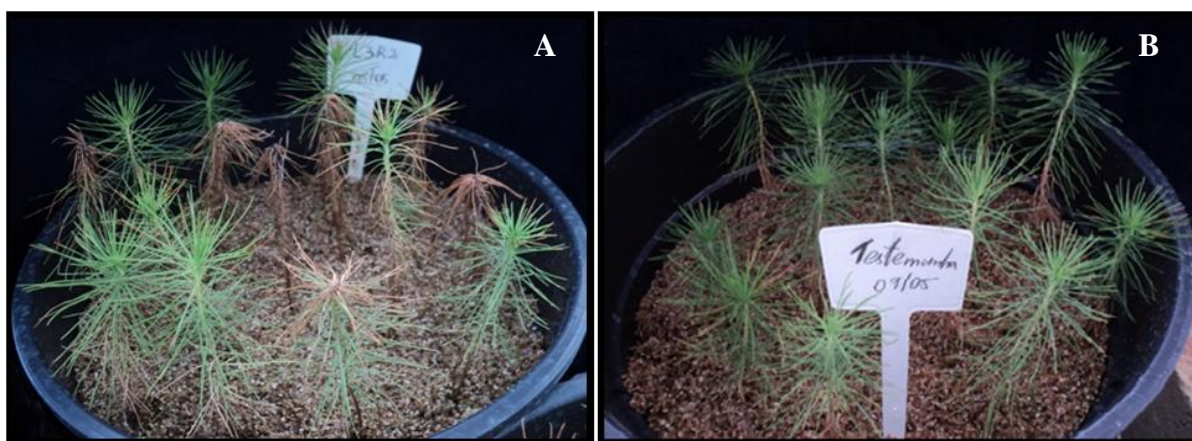
<sup>1</sup>Valores de severidade da doença (média de 15 plantas) de acordo com a escala descritiva baseada em sintomas: Nota 0 - planta sem sintomas; Nota 1 - planta com as acículas descoloridas; Nota 2 - planta com leve curvatura apical e murcha; Nota 3 - planta morta.

<sup>2</sup>Valores de incidência expressos em percentagem

<sup>3</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>4</sup>AACPD - Área abaixo da curva de progresso da doença.





**FIGURA 6.** Teste de patogenicidade e agressividade de isolados de *Fusarium subglutinans* em mudas de *P. taeda*: A) Sintomas de descoloração das acículas, murcha e morte de mudas inoculadas com isolado L3R2, o mais agressivo de *F. subglutinans*. B) Mudanças sadias do tratamento controle.

### Qualidade fisiológica das sementes de *Pinus taeda*

A percentagem de plântulas normais, plântulas anormais, sementes duras, dormentes e mortas, relativa aos seis lotes de sementes e o respectivo grau de umidade das sementes da primeira contagem de germinação e germinação estão listadas na Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente.

O percentual de plântulas normais foi superior quando houve tratamento de pré-esfriamento das sementes para quebra de dormência. Isto comprova que o tratamento para superação da dormência de *Pinus taeda* aumenta a percentagem de plântulas normais. O mesmo tratamento reduziu o percentual de plântulas anormais, sementes duras e sementes mortas. Segundo pesquisa realizada por Golle (2007), a variável percentagem de plântulas normais é eficiente para selecionar lotes de sementes de *P. taeda* com qualidade fisiológica superior.

**TABELA 6.** Primeira contagem de germinação (%) e grau de umidade de seis lotes de sementes de *Pinus taeda*, antes do pré-esfriamento.

| Primeira contagem de germinação (%) (antes do pré-esfriamento*) |                   |                    |                |                    |                 |                     |
|---|-------------------|--------------------|----------------|--------------------|-----------------|---------------------|
| Lote  | Plântulas Normais | Plântulas Anormais | Sementes Duras | Sementes Dormentes | Sementes Mortas | Grau de Umidade (%) |
| 1   | 35                | 9,0                | 38             | 0,0                | 18,0            | 12,9                |
| 2   | 35                | 9,0                | 38             | 0,0                | 18,0            | 14,1                |
| 3   | 76                | 5,0                | 13             | 0,0                | 6,0             | 12,9                |
| 4   | 65                | 4,0                | 19,0           | 0,0                | 12,0            | 13,4                |
| 5   | 66                | 12,0               | 15             | 0,0                | 7,0             | 13,7                |
| 11  | 59                | 5,0                | 30             | 0,0                | 6,0             | 13,7                |

\*Pré-esfriamento: tratamento para superação de dormência de sementes de *P. taeda* realizada em câmara fria a 5°C por 21 dias

**TABELA 7.** Germinação (%) e grau de umidade de seis lotes de sementes de *Pinus taeda* após o pré-esfriamento.

| Germinação (%) (após o pré-esfriamento*) |                   |                    |                |                    |                 |                     |
|--|-------------------|--------------------|----------------|--------------------|-----------------|---------------------|
| Lote                                     | Plântulas Normais | Plântulas Anormais | Sementes Duras | Sementes Dormentes | Sementes Mortas | Grau de Umidade (%) |
| 1  | 71                | 4,0                | 20             | 0,0                | 5,0             | 12,9                |
| 2  | 51                | 3,0                | 38             | 0,0                | 8,0             | 14,1                |
| 3  | 81                | 3,0                | 10             | 0,0                | 6,0             | 12,9                |
| 4  | 88                | 4,0                | 5,0            | 0,0                | 3,0             | 13,4                |
| 5  | 75                | 4,0                | 17             | 0,0                | 4,0             | 13,7                |
| 11                                       | 61                | 4,0                | 28             | 0,0                | 7,0             | 13,7                |

\*Pré-esfriamento: tratamento para superação de dormência de sementes de *P. taeda* realizada em câmara fria a 5°C por 21 dias

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, é possível apresentar as seguintes conclusões:

- O método de detecção de *Fusarium* spp. em sementes de *Pinus taeda* que apresentou maior sensibilidade foi o método meio seletivo.

- *Fusarium* spp. causou apodrecimento de sementes na fase de germinação, no entanto, não houve transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas no teste realizado.

- Foi identificada a espécie *Fusarium subglutinans* em sementes de *P. taeda*.

- A escala descritiva permitiu a avaliação da progressão dos sintomas da podridão de raiz causada por *Fusarium* spp. em *P. taeda*

- Dentre os 12 isolados de *Fusarium* spp. testados, nove se mostraram patogênicos a *P. taeda*, sendo que o isolado L3R2 de *Fusarium subglutinans* exibiu maior agressividade.

## REFERÊNCIAS

- ABEAS. **Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior. Ciência e Tecnologia de Sementes**. Curso de Especialização por Tutoria à Distância. Brasília: ABEAS, 1998. 51 p.
- ABRAF. **Anuário Estatístico da ABRAF 2012**. Ano base 2011/ ABRAF . – Brasília: 2012.
- AMORIM, L. Avaliação de doenças. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. Piracicaba: Ceres, 1995, v1, p. 648-650.
- ANDERSON, R. L. A new method for assessing contamination of slash and loblolly pine seeds by *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Plant Disease**, Saint paul, v. 70, n. 5, p. 452-453, 1986.
- ANDERSON, R. L.; BELCHER, E.; MILLER, T. Occurrence of seed fungi inside slash pine seeds produced in seed orchards in the United States. **Seed Science and Technology**, Zurich, n. 12, p. 795-799, 1984.
- AUER, C.G. Microrganismos internos em sementes de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barret & Golfari e *P. oocarpa* Schiede. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, n.1, p.45, jan./mar. 1993.
- AUER, C. G.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; SANTOS, A. F. dos. **Doenças em Pinus: identificação e controle**. Colombo- Embrapa Florestas, 2001.
- BAKER, J. B.; LANGDON, O. G. *Pinus taeda* L. In: BURNS, R. M.; HONKALA, B. H. (Coord.). *Silvics of North America*. Washington: USDA, **Forest Service**, 1990, v. 1, p. 497-512. (USDA. For. Serv. Agric. Handbook, 654).
- BAKER, K. F. & COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**. San Francisco: W. F. Freeman, 433 p., 1974.
- 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, nov./dez. 2005.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 4a. Ed. 1998.
- BENETTI, S. C.; SANTOS, A. F. dos.; MEDEIROS, A. C. S. de.; JACCOUD FILHO, D. S. Levantamento de fungos em sementes de cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. e *Pestalotia* sp. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, n. 58, p.81-85, jan/jun. 2009.
- BENÍTEZ, T.; RINCÓN, A. M.; LIMÓN, M. C.; CODÓN, A. C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, Madrid, v.7, n.4, p. 249-260, 2004.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7 – 9.

BETTIOL, W. GHINI, R.; Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (Eds.) **Métodos alternativos de Controle Fitossanitário**. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. P. 79-95.

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

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. (Ed.). **Introduction to plant disease epidemiology**. New York, NY: Wiley, 1990. 532p.

CASTELLANI, E. D.; SILVA, A.; BARRETO, M.; AGUIAR, I. B. Influência do tratamento químico na população de fungos e na germinação de sementes de *Bauhinia variegata* L. VAR. Variegata. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 18, n. 1, p. 41-44, 1996.

CARLUCCI, A.; COLATRUGLIO, L.; FRISULLO, S. First report of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus halepensis* and *P. pinea* in Apulia (Southern Italy). **Plant Disease** 91, 1683, 2007.

CARNEIRO, J. S. Microflora associada a sementes de essências florestais. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 557-566, 1986.

CARNEIRO, J. S. Testes de sanidade de sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de Sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. P. 386-393.

CARNEIRO, J. S. Qualidade sanitária de sementes de espécies florestais em Paraopeba, MG. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 75-77, 1990. B

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588p.

CONSTANTINO, V. **Efeitos de métodos de produção de mudas e equipes de plantadores na arquitetura do sistema radicular e no crescimento de *Pinus taeda* Linnaeus**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; DENARDIN, N. D.; SOARES, V. N.; SCHAFER, J. T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, nº 2, p.156-163, 2008.

CORRÊA, R. M. S. **Caracterização de *Phomopsis* e *Phoma* obtidos de sementes de espécies florestais**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

CRAM, M.M., FRAEDRICH, S.W. Seed diseases and seedborne pathogens of North America. **Tree Plant's notes**, v.53, p.35-44, 2010.

CUBBAGE, F. W.; ARUNA, P. B. Southern forests and economic conditions. **Forest Landowners**, v. 55, n. 2, 1996.

DWINELL, L.D.; PHELPS, W.R. Pitch canker of slash pine in Florida. **Journal of Forestry**, v.75, p.488-489, 1977.

FARIA, A. Y.; ALBUQUERQUE, M. C. F. de; NETO, D. C. Qualidade fisiológica de sementes de algodoeiro submetidas a tratamentos químico e biológico. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 25, nº 1, p. 121-127, 2003.

FERREIRA, A. R. **Análise genética e seleção em testes dialélicos de *Pinus taeda* L.** Tese de Doutorado (Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba - PR, 2005.

FOWELLS, H. A. (Comp.) *Silvics of forest trees of the United States*. Washington, DC: USDA, **Forest Service**, 1965. 761 p. (USDA. For. Serv. Agric. Handbook, 271).

GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. Fusariose em mudas de *Pinus taeda*. **Comunicado Técnico 166**. Embrapa Florestas- Colombo, 2006.

GUERRA-SANTOS, J.J. Pitch canker on Monterey pines in Mexico. *Forestry and Forest Products*. In: DEVEY, M. E.; MATHESON, A. C.; GORDON, T.R. **Current and Potential Impacts of Pitch Canker in *radiata* Pine**, v. 112, p.58-61, 1999.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**. v.84, n.4, p. 376–393, 2000.

HANIOJA, P. On damping-off fungi in the nurseries of Forest Research Institute at Punkaharju Experimental Station, *Communications Inst. For Fenn*, 69: 5-21, 1969.

HEPTING, G. H.; ROTH, E. R. Pitch canker, a new disease of some southern pines. **Journal of Forestry**. v.44, p.742-744, 1946.

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**, v.12, p.102-112.1986.

HWANG, J.; BENSON, D. M. Biocontrol of *Rhizoctonia* stem and root rot of poinsettia with *Burkholderia* and binucleate *Rhizoctonia*. **Plant Disease**. v.86, p. 47-53, 2002.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2011/default.shtm>> Acesso em: 05 jan. 2013.

JUNQUEIRA, N. T. V; GASPAROTTO, L. Controle biológico de fungos estomáticos causadores de doenças foliares em Seringueira. In: **Controle biológico de doenças de plantas** (Bettiol, W., ed). Jaguariúna, CNPDA/ Embrapa, p. 307-331, 1991.

KAGEYAMA, P. Y. Fatores que afetam a produção de sementes florestais. In: **Simpósio Brasileiro sobre Tecnologia de Sementes Florestais**, 1., 1984, Belo Horizonte. Anais... Brasília, DF: ABRATES, 1985. P. 11-33.

KRONKA, F. J. N.; BERTOLANI, F.; PONCE, R. H. **A cultura do Pinus no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura, 2005. 185 p.

KRUGNER, T. L.; AUER, C. G. Doenças dos eucaliptos. In: KIMATI, J.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A.; BERGAMIN, A. F.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. Piracicaba: Ceres, 2005, v2, p. 319-322.

LANDERAS, E.; GARCIA, P.; FERNÁNDEZ, Y.; BRAÑA, M.; FERNÁNDEZ-ALONSO, O.; Outbreak of pitch canker caused by *Fusarium circinatum* on *Pinus* spp. in northern Spain. **Plant Disease** 89, 1015, 2005.

LASCA, C. C.; SAMPAIO, A. S.; CINTRA, A. F. Condições fitossanitárias de sementes importadas de *Pinus* spp. **O Biológico**, São Paulo, v. 37, n. 11, p. 287-292, 1971.

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**. vol.36 n°2 Botucatu Apr./June 2010.

LAZAROTTO, M.; BRIÃO MUNIZ, M. F.; BELTRAME, R.; SANTOS, A. F. dos; MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região Sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, jul.-set., 2012.

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. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: [http://www.infobios.com/Artigos2009\\_1/trichoderma/index.htm](http://www.infobios.com/Artigos2009_1/trichoderma/index.htm). Acesso em 29 dez 2012.

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.

LUMSDEN, R. D.; LOCKE, J. C. (1989). Biological control of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani* damping-off with *Gliocadium virens* in soilless mix. **Phytopathology**, 79, 361-366.

LUZ, W. C. da. 1991a. Seed microbiolization to control soilborne pathogens of wheat. In: **XII International Planta Protection Congress**, Rio de Janeiro. Int. Soc. Plant. Prot., p. (Abstract).

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.

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.

MACIEL, C. G. ***Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS, 2012.

MACIEL, C. G.; LONGHI, S. J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrela fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 3, p. 493-503, jul.-set., 2012.

MACHADO, J. C. **Introdução à patologia de sementes: fundamentos e aplicações.** Brasília, DF: MEC: ESAL: FAEPE, 1988. 106 p.

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

MARTINS NETTO, D. M.; FAIAD, M. G. R. Viabilidade de Sementes de Espécies Florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 75- 80,1995.

MARTINS, M. K. **Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira.** Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba-SP, 2005.

MELO, I. S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* sp. no controle biológico de

doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas.** Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991, p. 7-23.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico.** v.1. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17-60.

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 Agronômica**, Fortaleza, v. 36, n. 1, p. 118– 122, jan./ abr. 2005.

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

MITTAR, R. K. Studies on the mycoflora and its control on the seeds of some forests trees: I *Cedrus deodora*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, p. 197-201, 1981.

MITTAR, R. K. Studies on the mycoflora and its control on the seeds of some forests trees: III *Eucalyptus hybrid*. **Malaysian Forester**, Kuala Lumpur, v. 49, p. 151-159, 1986.

MONTALVÃO, S. C. L. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças do tomateiro.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Brasília, Brasília – DF, 2012.



MUCCI, F. E. S.; LASCA, C. C. Flora fúngica de sementes de essências florestais nativas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 352, 1986.

MURAMOTO, M., DIWNELL, L. D. Pitch canker of *Pinus luchuensis* in Japan. **Plant Disease**, v.74, p.530, 1990.

NETTO, D. A. M.; FAIAD, M. G. R. Viabilidade e sanidade de sementes de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v.17, n.1, p.75-80, 1995.

PARISI, J. J. D. Doenças em mudas e tipos de associações entre fungos e sementes florestais. In: SANTOS, A. F. dos; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo, 2011. Cap. 3, p. 37-48.

PÉREZ-SIERRA, A.; LANDERAS, E.; LEÓN, M.; BERBEGAL, M.; GARCIA-JIMÉNEZ, J.; ARMENGOL, J. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. **Mycological Research** 111, 832—839, 2007.

REGO, S. S.; SANTOS, A. F.; MEDEIROS, A. C. S.; FILHO, D. S. J. Fungos associados às sementes de baguaçu. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 379, 2008.

RAHALKAR, P. W.; NEEGAARD, P. Studies on aerofungin as seed treatment in controlling seed borne fungal diseases. **Hindustan Antibiotics Bulletin**, v. 11, n. 3, p. 163-165, 1969.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas – procedimentos**. Viçosa: Editora UFV, 2007. 172 p.

RUIZ FILHO, R.R; SANTOS, A.F.dos.; MEDEIROS, A.C.S.; JACCOUD FILHO, D.S. Fungos associados às sementes de cedro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.30, n.4, p. 494 – 496, 2004.

SALES, N. L. P. **Efeito da população fúngicas e do tratamento químico no desempenho de sementes de ipê-amarelo, ipê-roxo e barbatimão**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 1992.

SANTOS, G. R. et al. Transporte, transmissibilidade e patogenicidade da microflora associada à sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 43, n. 249, p. 621-627, 1996.

SANTOS, A. F. dos; MEDEIROS, A. C.; SANTANA, D. L. Q. Fungos em sementes de espécies arbóreas da Mata Atlântica. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 26, supl., p. 221, 2000. Edição dos resumos do 23º Congresso Paulista de fitopatologia, 2000, Campinas.

SANTOS, A. F. dos; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo: Embrapa- CNPF, 2011.

SANTOS, A. F. dos.; PARISI, J. J. D. Características dos fungos associados às sementes florestais. In: SANTOS, A. F. dos.; PARISI, J. J. D.; MENTEN, J. O. M. **Patologia de Sementes Florestais**. Colombo, 2011. Cap. 7, p. 87-104.

SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 456-458, jul./ago. 2004.

SHIMIZU, J. Y. **Cultivo do Pinus**: espécies. Versão eletrônica. Nov./2005. Disponível em: <[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinus/CultivodoPinus/03\\_2\\_pinus\\_taeda.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinus/CultivodoPinus/03_2_pinus_taeda.htm)>. Acesso em: 06/01/2013.

SHIMIZU, J. Y. **Pinus na Silvicultura Brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

SHIMIZU, J. Y.; SEBBENN, A. M.; Espécies de *Pinus* na Silvicultura Brasileira. In: **Pínus na Silvicultura Brasileira**. Colombo: Embrapa Florestas, 2008.

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.

SNEH, B.; ICHIELEVICH-AUSTER, M. Induced resistance of cucumber seedlings caused by some non-pathogenic *Rhizoctonia* (np-R) isolates. **Phytoparasitica**. v.26, n.1, p. 27-38, 1998.

SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de sementes**. Jaciro Soave e Magaly Veloso da Silva, eds. Campinas: Fundação Cargill, 1987.

TINT, H. Studies in the *Fusarium* damping-off of conifers. I. The comparative virulence of certain Fusaria. **Phytopathology**, 35: 421-439, 1945.

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.

VILJOEN, A.; WINGFIELD, M. J.; MARASAS, W. F. O (1994) First report of *Fusarium subglutinans* f. sp. *pini* on seedlings in South Africa. **Plant Disease** 78, 309--312.

WINGFIELD, M. J.; JACOBS, A.; COUTINHO, T. A.; AHUMADA, R.; WINGFIELD, B. D. First report of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, on pines in Chile. **Plant Pathology**, v.51, p.397, 2002.

## CAPÍTULO II - MICROBIOLIZAÇÃO *in vitro* E *in vivo* DE SEMENTES DE *P. taeda* PARA CONTROLE DE *Fusarium* spp.

**RESUMO** - Viveiros comerciais de pinus vêm apresentando podridão de raízes causada por *Fusarium* spp. na região sul do país. A doença pode estar associada à transmissão de *Fusarium* spp. das sementes para as plântulas de pinus, constituindo-se uma importante fonte de inóculo. O tratamento de sementes florestais é uma prática que pode eliminar os fitopatógenos garantindo a obtenção de uma muda com boa qualidade sanitária e silvicultural. Os objetivos do presente trabalho foram: I) avaliar a eficiência do antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. através do pareamento de culturas, produção de metabólitos voláteis e não-voláteis; II) avaliar o controle *in vitro* e *in vivo* de *Fusarium* spp. através da microbiolização com *Trichoderma* spp. e tratamento químico com tiofanato metílico + clorotalonil de três lotes sementes de *P. taeda* naturalmente infestadas com *Fusarium* spp. O delineamento do experimento I foi o inteiramente casualizado sendo 13 tratamentos (12 isolados de *Trichoderma* spp. pareados com 2 isolados de *Fusarium* spp.) e mais a testemunha com quatro repetições. O delineamento do experimento II foi o inteiramente casualizado com quatro tratamentos e quatro repetições. Os parâmetros avaliados após a microbiolização e tratamento químico de três lotes de sementes de *P. taeda* foram: percentual de plântulas emergidas (PE), plântulas sintomáticas (PS), PS com *Fusarium* spp., sementes não germinadas (SNG) e SNG com *Fusarium* spp. Além destas variáveis, foram avaliadas a velocidade de emergência (VE) e o crescimento das plântulas, sendo o delineamento experimental o de blocos casualizados sendo três blocos por lote de semente e quatro tratamentos. Foi realizado experimento idêntico ao II em um lote de sementes de *P. taeda* previamente inoculadas com *Fusarium subglutinans*. No experimento I, todos os isolados de *Trichoderma* spp., exceto TR106, reduziram o crescimento micelial de *Fusarium* spp. Houve efeito da produção de metabólitos voláteis por todos os isolados de *Trichoderma* spp. na redução do crescimento de *Fusarium* spp. Só houve efeito da produção de metabólitos não-voláteis dos isolados de *Trichoderma* spp. quando estes foram confrontados com o isolado TD2 de *Fusarium* spp. Houve redução significativa na incidência *in vitro* de *Fusarium* spp. nos três lotes de sementes que foram microbiolizadas e tratadas com tiofanato metílico + clorotalonil. A percentagem de PE com *Fusarium* spp. foi significativamente menor no lote 2, a de SNG foi maior no lote 4 e a de SNG com *Fusarium* spp. foi menor no lote 2. Houve efeito de tratamento químico e biológico para a maior percentagem de PE, menor percentagem de SNG e SNG com *Fusarium* spp. A maior velocidade de emergência foi verificada nas plântulas cujas sementes foram microbiolizadas com *Trichoderma* spp. As sementes tratadas com tiofanato metílico + clorotalonil e *Trichoderma* spp. apresentaram maior altura de plântulas. Nas sementes inoculadas com *F. subglutinans*, houve efeito positivo dos tratamentos com *Trichoderma* spp. e com fungicida na redução do percentual de PS e na maior média de altura das plântulas. Os tratamentos biológico e químico se mostraram eficientes e promissores na redução de *Fusarium* spp. e de seus efeitos deletérios sobre as plântulas e apresentaram efeito positivo no crescimento das plântulas de *P. taeda*.

**Palavras-chaves:** controle biológico; sementes florestais, patologia florestal, *Fusarium subglutinans*

**MICROBIOLIZATION *in vitro* AND *in vivo* OF *P. taeda*'s SEEDS TO CONTROL  
*Fusarium* spp.**

**ABSTRACT** - Commercial nurseries of pinus are presenting root rot caused by *Fusarium* spp. in the southern region of the country. The disease may be associated with the transmission of *Fusarium* spp. seeds to pinus' seedlings, constituting an important source of inoculum. The treatment of forestry seeds is a practice that can eliminate pathogens, ensuring the obtainment of a seedling with good quality health and silvicultural. The objective of this study was to: I) evaluate the efficiency of *in vitro* antagonism of *Trichoderma* spp. through cultures pairing, production of metabolites volatile and non-volatile; II) evaluate the control *in vitro* and *in vivo* of *Fusarium* spp. through microbiolization with *Trichoderma* spp. and chemical treatment with methyl thiophanate + chlorothalonil three seed batches of *P. taeda* naturally infested with *Fusarium* spp.. The experimental design of the experiment I was completely casualized with 13 treatments (12 isolates of *Trichoderma* spp. paired with 2 isolates of *Fusarium* spp.) in addition to the witness with four repetitions. The design of the second experiment was completely randomized with four treatments and four repetitions. The parameters evaluated after microbiolization and chemical treatment of three seed lots of *P. taeda* were: percentage of emerged plantlets (EP), symptomatic plantlets (SP), SP with *Fusarium* spp., non-germinated seeds (NGS) and NGS com *Fusarium* spp. Beyond these variables speed of emergence (SE) and seedling growth were evaluated, and the experimental design of randomized blocks with three blocks per batch of seeds and four treatments. Identical experiment to II was performed in a batch of seeds of *P. taeda* previously inoculated with *Fusarium subglutinans*. In the experiment I, all isolated *Trichoderma* spp., except TR106, reduced the mycelial growth of *Fusarium* spp. There were effects from volatile metabolites production by all isolated of *Trichoderma* spp. in reducing the growth of *Fusarium* spp. However, the production of non-volatile metabolites only had significant effect on the production of *Trichoderma* spp. when they were confronted with the isolated *Fusarium* spp. TD2. There was significant reduction in the incidence *in vitro* of *Fusarium* spp. in three batches of microbiolized seeds and treated with methyl thiophanate + chlorothalonil. The percentage of EP and SP didn't differ between the seed batches evaluated. The percentage of EP with *Fusarium* spp. was significantly lower in batch 2, of the NGS was higher in batch 4 and of the NGS with *Fusarium* spp. was lower in batch 2. There was an effect of chemical and biological treatment for the highest percentage of EP, and lower percentage of NGS and NGS with *Fusarium* spp. The higher emergency speed was verified in the plantlets which seeds were microbiolized with *Trichoderma* spp. The treated seeds with methyl thiophanate + chlorothalonil and *Trichoderma* spp. showed greater height of plantlet. In inoculated seeds with *F. subglutinans* there was positive effect on the treatment with *Trichoderma* spp. and fungicide in reducing the percentage of SP and the highest average of plantlets. The biological and chemical treatments showed to be efficient and promising in the reduction of *Fusarium* spp. and its deleterious effects on the plantlets and showed positive effect in the plantlets growth of *P. taeda*.

**Key-words:** biological control; forest seeds, forest pathology, *Fusarium subglutinans*

## INTRODUÇÃO

Para a economia brasileira e para a sociedade em geral, o setor de florestas plantadas contribui com uma parcela importante na geração de produtos, tributos, empregos e bem estar. O setor florestal também é estratégico no fornecimento de matéria-prima e produtos para a exportação e ainda contribui, de maneira direta, na conservação e preservação dos recursos naturais (ABRAF, 2012). A produção de madeira de florestas plantadas visa substituir a exploração de florestas nativas. Os principais gêneros utilizados para reflorestamentos no território nacional são *Eucalyptus*, *Pinus* e *Acacia* (MACIEL, 2012).

*Pinus taeda* é natural das regiões sul e sudeste dos Estados Unidos, ocorrendo entre as Latitudes 28° e 39° Norte e Longitudes 75° a 97° Oeste. De acordo com Baker e Langdon (1990), *P. taeda* é uma espécie que se adapta a vários tipos de habitats e a uma grande variação ambiental, o que permitiu sua distribuição natural em 14 estados dos EUA. Apesar de ser uma espécie exótica no Brasil, *P. taeda* é plantado em extensas áreas nas Regiões Sul e Sudeste, onde existe clima fresco e inverno frio, com disponibilidade constante de água, solo bem drenado, onde não haja déficit hídrico (SHIMIZU, 2005). Segundo a Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas (ABRAF), a área plantada de *Pinus* no Brasil é de 1.641.892 ha e está concentrada principalmente na região Sul (83%) (ABRAF, 2012).

A qualidade sanitária de sementes é fundamental para a obtenção e oferta de mudas sadias e, conseqüentemente, para o sucesso no estabelecimento do empreendimento florestal. Os fitopatógenos podem ser transmitidos ainda no campo ou nos processos subsequentes de beneficiamento provocando severa redução na germinação das sementes ou, ainda, tombamento no período de pós-emergência (CARNEIRO, 1987). Em seu trabalho pioneiro com sementes importadas de várias espécies de *Pinus*, Lasca et al. (1971) detectaram os gêneros fúngicos: *Pestalotia*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Trichothecium*, *Alternaria*, *Diplodia*, *Botryodiplodia*, *Helminthosporium*, *Chaetomium*, *Rhizopus*, *Neurospora* e *Penicillium*.

Várias espécies de *Fusarium* vêm sido identificadas causando danos ao gênero *Pinus* no país (VENTURA, 1999), principalmente em sementes e em plântulas causando tombamento de mudas (MENDES et al., 1998). Poucas pesquisas já relataram associação de *Fusarium* com sementes de *P. taeda* (LASCA, et al., 1971; CARNEIRO, 1986; HOMECHIN et al., 1986). *Fusarium* spp. podem ser transmitidos via sementes infectadas durante a germinação e formação de mudas, causando danos na pré-emergência destruindo as sementes

ou na pós-emergência danificando as plântulas causando lesões no colo até destruir os tecidos provocando tombamento e morte da muda (CARNEIRO, 1987).

O tratamento de sementes florestais apesar de ainda pouco estudado (SANTOS, et al., 2011), constitui uma ferramenta importante para evitar a disseminação de patógenos e garantia da qualidade sanitária e silvicultural. Contudo, devem-se buscar também as qualidades genéticas, fisiológica e física através das análises de germinação, vigor e pureza. Rotineiramente, não são feitos tratamentos das sementes florestais devido às poucas pesquisas com patologia de sementes e à falta de produtos químicos e biológicos registrados (PARISI et al., 2011; SANTOS et al., 2011). Contudo, existem relatos na literatura a respeito da eficiência de fungicidas no tratamento de sementes florestais (SALES, 1992; SANTOS, et al., 2011). Testes experimentais mostraram que o uso de carbendazin, caboxin, captan, thiabendazole e thiram garantem a sanidade de plântulas de *Pinus* sp., apesar de não existirem produtos registrados (KRUGNER; AUER, 2005).

Restrições ao uso de fungicidas e os cuidados com o meio ambiente reforçam a busca por alternativas viáveis (LUZ, 2001) e menos nocivas a natureza e à saúde humana, como os bioprotetores. A microbiolização de sementes constitui uma possibilidade de controle de patógenos com a vantagem de não ser poluente, além de contribuir com o controle mais estável da doença e tem se mostrado eficiente no controle de patógenos associados a elas, especialmente para culturas agrícolas (LUDWIG, 2009). Entretanto, são necessários mais estudos para a extensão e aperfeiçoamento desta técnica para sementes de espécies florestais.

Diante do que foi exposto, os objetivos deste trabalho são: a) avaliar o antagonismo de *Trichoderma* spp. através do pareamento de culturas, produção de metabólitos voláteis e não-voláteis (*in vitro*); b) avaliar o controle *in vivo* e *in vitro* de *Fusarium* spp. através do tratamento químico com tiofanato metílico + clorotalonil e da microbiolização de sementes de *P. taeda* com *Trichoderma* spp.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção e preservação de isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp.

Os isolados TR2A, TR2B, TRB1, TRB2, TRA, TRC, TRD E TR0506 de *Trichoderma* spp. e os isolados TS2 e TD2 de *Fusarium* spp. foram obtidos a partir de isolamento de raízes de mudas sintomáticas de 6 meses de idade de *Pinus taeda* provenientes do viveiro comercial do município de Guarapuava no estado do Paraná. Os demais isolados de *Trichoderma* spp. foram obtidos a partir de sementes de *P. taeda* (TRS, TR106, e TRE) junto ao Laboratório de Patologia Florestal da Embrapa Florestas e raiz de álamo (TRF), como mostra a Tabela 1.

**TABELA 1.** Isolados de *Trichoderma* spp. e de *Fusarium* spp. utilizados neste estudo.

| Isolados <i>Trichoderma</i> spp. | Material de origem | Local e ano de coleta     |
|----------------------------------|--------------------|---------------------------|
| TR2A                             | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TR2B                             | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TRB1                             | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TRB2                             | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TR106                            | Semente de pínus   | EMBRAPA,Colombo - PR/2012 |
| TRS                              | Semente de pínus   | EMBRAPA,Colombo - PR/2012 |
| TRA                              | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TRC                              | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TRD                              | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TR0506                           | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TRE                              | Semente de pínus   | EMBRAPA,Colombo - PR/2012 |
| TRF                              | Raíz de álamo      | EMBRAPA,Colombo - PR/2012 |
| Isolados <i>Fusarium</i> spp.    | Material de origem | Local e ano de coleta     |
| TD2                              | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |
| TS2                              | Raíz de pínus      | Guarapuava - PR/2011      |

### Crescimento micelial em culturas pareadas: *Trichoderma* x *Fusarium*

Foi realizado o pareamento de colônias entre 12 isolados de *Trichoderma* spp. e dois isolados de *Fusarium* spp., TD2 e TS2. Estes isolados se mostraram patogênicos a *P. taeda*, em teste realizado previamente ao presente experimento, e se destacaram dentre os demais isolados de *Fusarium* spp. testados quanto a agressividade.

Os isolados de *Trichoderma* spp. e *Fusarium* spp. foram cultivados em meio batata-dextrose-ágar (BDA) durante sete e 12 dias, respectivamente, considerando a diferença da velocidade de crescimento micelial do patógeno em relação ao antagonista. Discos de BDA de 5 mm, contendo cultura pura de cada isolado de *Trichoderma* sp. e de *Fusarium* sp., foram colocados em placas de Petri em lados opostos, e, para o tratamento controle foram colocados apenas discos de *Fusarium* sp. em oposição.

As culturas foram colocadas em câmara BOD regulada para fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 25°C por sete dias. As avaliações foram realizadas sete dias após a incubação, determinando-se o grau de antagonismo (G) de acordo com a escala de notas de Bell et al. (1982), onde: nota 1 - o antagonista cobrindo a totalidade da placa de Petri; nota 2 - o antagonista cobrindo pelo menos 2/3 da superfície da placa; nota 2,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 5/8 da superfície do meio; nota 3 - o antagonista cobrindo ao menos 50% da superfície; nota 3,5 - crescimento de *Trichoderma*, ocupando 3/8 da superfície do meio; nota 4 - o patógeno cobrindo ao menos 2/3 da superfície da placa; nota 5 - o patógeno cobrindo a totalidade da superfície da placa, anulando o antagonista. Para determinar a percentagem de inibição do crescimento do patógeno mediu-se o diâmetro das colônias (comprimento e largura) do fitopatógeno e do antagonista com auxílio de um paquímetro digital e o percentual foi calculado de acordo com Edginton et al. (1971), através da fórmula:

$$\text{- Porcentagem de inibição (PI\%)} = (Dc - Dt / Dc) \times 100$$

Onde Dc é o diâmetro médio da colônia do patógeno das placas do controle e Dt é o diâmetro médio da colônia dos isolados de *Fusarium* nos tratamentos testados.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, sendo doze tratamentos e quatro repetições (para cada isolado de *Fusarium* spp.).

### **Efeito da produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* spp.**

A avaliação do efeito da produção de metabólitos voláteis foi verificada através do método de Mariano (1993). Foram utilizados dois isolados de *Fusarium* spp.: TD2, TS2 e um isolado de *F. subglutinans* (L3R2) previamente selecionado no teste de agressividade em mudas. Os isolados TR0506, TRB1 e TRB2 de *Trichoderma* spp. que se destacaram no teste de culturas pareadas foram confrontados com os isolados do fitopatógeno. Os isolados de *Fusarium* spp. foram cultivados em placas de Petri com meio BDA suplementado com 40



ppm de clorafenicol e 80 ppm de ampicilina e estas foram incubadas em câmara BOD regulada para fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 24 °C durante 12 dias.

Os isolados de *Trichoderma* spp. foram cultivados nas mesmas condições, entretanto o meio BDA não foi suplementado com antibióticos e o tempo de incubação foi de apenas sete dias em função da sua maior velocidade de crescimento em relação ao *Fusarium* spp. Discos de micélio de cinco mm de diâmetro do patógeno e do antagonista foram inoculados separadamente em meio BDA no centro de placas de Petri. Após 24 horas, as placas contendo o fitopatógeno foram sobrepostas às do antagonista, e ambas unidas por filme PVC para impedir o escape de metabólitos voláteis.

As placas foram incubadas em câmara BOD nas mesmas condições já mencionadas no experimento I. A testemunha recebeu apenas discos de micélio de ambos os patógenos tanto na parte superior quanto na parte inferior da placa de Petri. A avaliação foi realizada sete dias após a montagem do experimento, pela medição dos diâmetros das colônias do patógeno, comparando-os com a testemunha. A partir desta medição, foi calculada a percentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium* spp. pelos metabólitos voláteis produzidos por *Trichoderma* spp., de acordo com Edginton et al. (1971), através da fórmula:

$$\text{- Porcentagem de inibição (PI\%)} = (Dc - Dt / Dc) \times 100$$

Onde Dc é o diâmetro médio da colônia do patógeno das placas do controle e Dt é o diâmetro médio da colônia dos isolados de *Fusarium* nos tratamentos testados.

O delineamento inteiramente casualizado conteve quatro tratamentos (três isolados do antagonista mais a testemunha) com quatro repetições. A análise estatística foi realizada individualmente para cada isolado de *Fusarium* spp., considerando as particularidades de cada estirpe quanto a agressividade. Os valores do diâmetro das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.6 beta (2012).

### **Efeito da produção de metabólitos não voláteis por *Trichoderma* spp.**

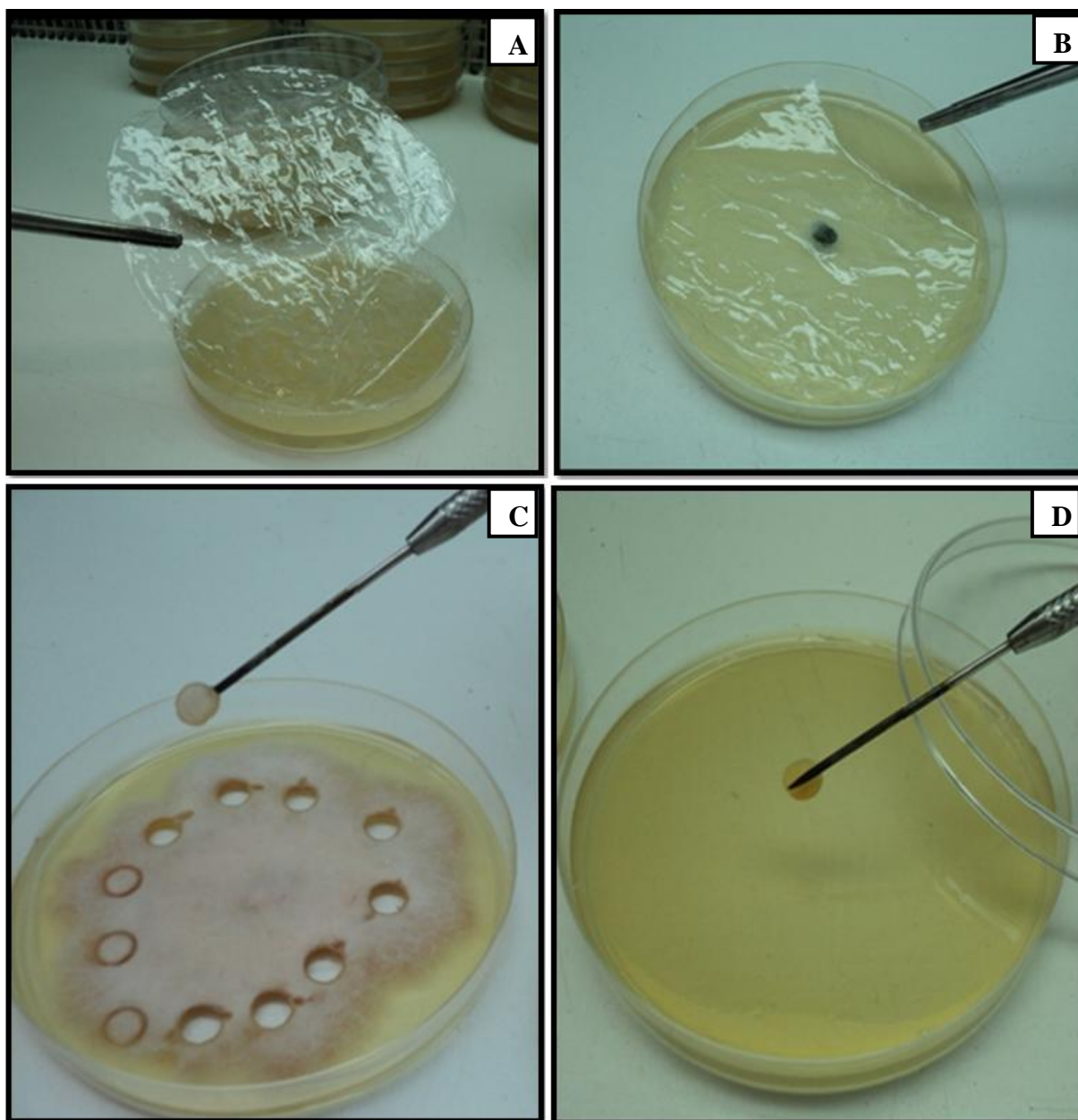
O efeito da produção de metabólitos não voláteis foi verificado pelo método de MICHEREFF et al. (1993), onde o meio de BDA contido em placas de Petri foi coberto por discos de papel celofane esterilizado. Em seguida, no centro da placa, foi colocado um disco de micélio de cinco mm de cada um dos três isolados do agente de biocontrole (TR0506, TRB1 E TRB2), permanecendo incubados por 72 horas, a 25 °C e 12 horas de fotoperíodo. Após este tempo, retirou-se o papel celofane com as culturas de *Trichoderma* spp. aderentes e transferiu-se para o centro das placas um disco de micélio do fitopatógeno, depois de 12 dias de incubação. O procedimento deste teste está descrito na Figura 1. O papel celofane, semi-permeável, permite a nutrição e crescimento do antagonista, além da difusão de metabólitos para o meio de cultura (ETHUR, 2002), onde são inseridos discos contendo estruturas do patógeno. Foram utilizados os isolados L3R2, TD2 e TS2 de *Fusarium* spp. para este teste.

A testemunha consistiu no cultivo do patógeno após a retirada do celofane, sem a prévia sobreposição do antagonista. A avaliação foi realizada sete dias após a repicagem, medindo-se os diâmetros das colônias do patógeno em contato com os metabólitos produzidos pelos antagonistas, comparando-se com a testemunha. A partir desta medição, foi calculada a percentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium* spp. pelos metabólitos não voláteis produzidos por *Trichoderma* spp., de acordo com Edginton et al. (1971), através da fórmula:

$$\text{- Porcentagem de inibição (PI\%)} = (Dc - Dt / Dc) \times 100$$

Onde Dc é o diâmetro médio da colônia do patógeno das placas do controle e Dt é o diâmetro médio da colônia dos isolados de *Fusarium* nos tratamentos testados.

O delineamento inteiramente casualizado conteve quatro tratamentos (três isolados do antagonista mais a testemunha) com quatro repetições. A análise estatística foi realizada individualmente para cada isolado de *Fusarium* spp., considerando as particularidades de cada estirpe quanto a agressividade. Os valores do diâmetro das colônias foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com a utilização do programa ASSISTAT, versão 7.6 beta (2012).



**FIGURA 1.** Teste de metabólitos não voláteis: A) Papel celofane sobreposto ao meio de cultura BDA; B) Retirada do celofane com a cultura de *Trichoderma* spp. aderente; C e D) Transferência de disco de micélio de *Fusarium* spp. para o centro da placa de Petri.

**Análise *in vitro* da microbiolização de sementes de *P. taeda* naturalmente infestadas para controle de *Fusarium* spp.**

Foram utilizados três lotes de sementes com diferentes incidências de *Fusarium* spp.: alta incidência (94% de *Fusarium* spp.- lote 4); média incidência (49% de *Fusarium* spp.- lote 11); e baixa incidência (12% de *Fusarium* spp.- lote 2).

As sementes foram microbiolizadas com dois isolados de *Trichoderma* spp. (TRB1 e TRB2) previamente selecionados no teste de pareamento de culturas e mantidos em tubos de ensaio com batata-dextrose-ágar (BDA) e tratadas com fungicida tiofanato metílico + clorotalonil. Para o teste da análise da microbiolização *in vitro* das sementes de *P. taeda* foram utilizadas placas de Petri contendo meio seletivo para crescimento de *Fusarium*. Este meio foi preparado com 15 g de peptona, 5 g de MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de PCNB (pentacloronitrobenzeno) e 20 g de ágar em 1000 mL de água destilada (ANDERSON, 1986). O meio foi suplementado com 40 ppm de clorafenicol e 80 ppm de ampicilina antes de ser vertido em placas de Petri.

Para o preparo da suspensão de 10<sup>6</sup> conídios. mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma* spp., os isolados foram cultivados em meio BDA em placas de Petri e incubados durante sete dias a 24 °C. Foram adicionados 10 mL de água destilada esterilizada nas placas de Petri totalmente colonizadas por *Trichoderma* spp. para obtenção da suspensão. A raspagem do fungo foi feita com bastão de vidro esterilizado e a suspensão foi devidamente peneirada em recipiente de vidro esterilizado. As sementes foram mergulhadas na suspensão durante cinco minutos. A contagem de conídios foi realizada com auxílio da câmara de Neubauer.

Para tratamento com o fungicida, as sementes foram colocadas em recipiente de vidro esterilizado contendo 0,01 g de tiofanato metílico + clorotalonil, considerando a dose do produto comercial (p.c.) de 2,15 g de p.c./kg de sementes de *P. taeda*, misturados a 2,33 mL /kg de sementes de *P. taeda* de água destilada esterilizada (5 % de água em relação ao peso das sementes de *P. taeda*). Após o contato das sementes com o fungicida, estas foram agitadas durante cinco minutos para melhor aderência ao produto. Depois de tratadas, as sementes de *P. taeda* foram colocadas, com auxílio de uma pinça esterilizada, sobre o meio seletivo preparado com 15 g de peptona, 5 g de MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O, 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g de PCNB (pentacloronitrobenzeno), 40 ppm de cloranfenicol e 80 ppm de ampicilina em 1000 mL de água destilada. Para o tratamento testemunha as sementes não tratadas e não desinfetadas foram colocadas sobre o meio seletivo. As placas de Petri foram incubadas a 20 °C, sob luz fluorescente, em fotofase de 12 horas, por 14 dias.

Após este período, as sementes foram avaliadas quanto à presença de *Fusarium* spp. com o auxílio de microscópio estereoscópio e observação de lâminas no microscópio óptico. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo quatro tratamentos e quatro repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento.

### **Análise *in vivo* da microbiolização de sementes de *P. taeda* naturalmente infestadas para controle de *Fusarium* spp.**

Foram utilizados três lotes de sementes com diferentes incidências de *Fusarium* spp.: alta incidência (94% de *Fusarium*- lote 4); média incidência (49% de *Fusarium*- lote 11); e baixa incidência (12% de *Fusarium*- lote 2).

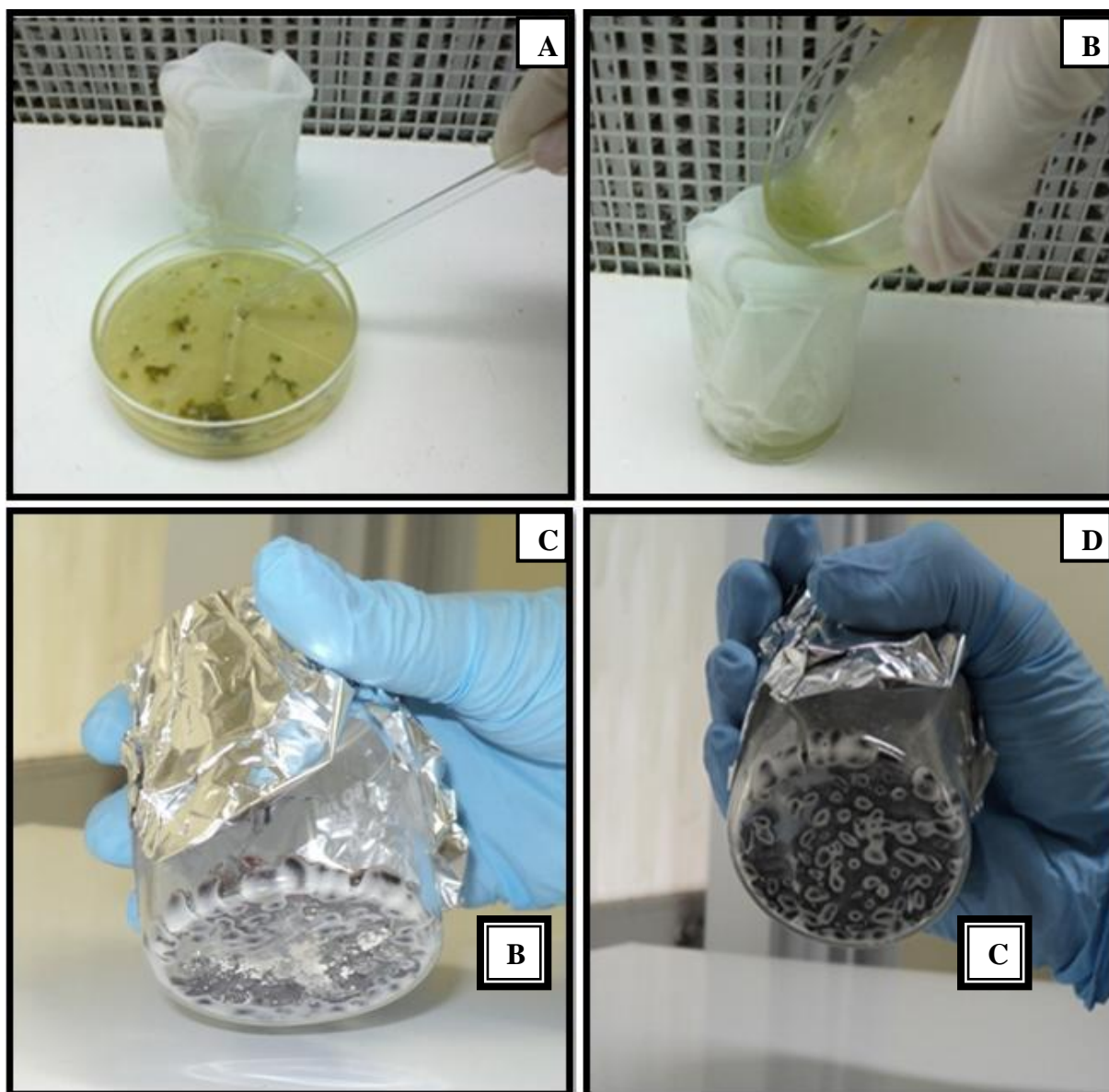
As sementes de *P. taeda* foram colocadas em câmara úmida e deixadas em câmara fria durante 28 dias, para superação de dormência, antes de serem tratadas e semeadas. Foram utilizadas bandejas de polietileno de 200 células devidamente desinfestadas com hipoclorito 2% para a semeadura das sementes em vermiculita.

As sementes foram microbiolizadas com dois isolados de *Trichoderma* spp. (TRB1 e TR0506) previamente selecionados no teste de pareamento de culturas e mantidos em tubos de ensaio com batata-dextrose-ágar (BDA) e tratadas com o fungicida tiofanato metílico + clorotalonil. Os isolados foram cultivados em meio BDA e incubados durante sete dias a 24 °C em câmara BOD.

Foram adicionadas 10 mL de água destilada nas placas de Petri e com o auxílio de um bastão de vidro esterilizado o fungo foi raspado e a suspensão foi devidamente peneirada. Foi preparada uma suspensão de  $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup> de *Trichoderma* spp. As sementes foram mergulhadas na suspensão durante cinco minutos antes de serem semeadas.

Para tratamento com o fungicida as sementes foram colocadas em recipiente de vidro esterilizado contendo 2,15 g de p.c./ Kg de sementes, misturadas a 2,33 mL /kg de sementes de *P. taeda* de água destilada esterilizada (5 % de água em relação ao peso das sementes de *P. taeda*). Após o contato das sementes com o fungicida, estas foram agitadas durante cinco minutos para melhor aderência do fungicida às sementes. Depois de tratadas, as sementes de *P. taeda* foram semeadas em vermiculita em bandejas de polietileno de 200 células. Os tratamentos químico e biológico das sementes de *P. taeda* estão ilustrados na Figura 2.

O delineamento utilizado foi o de inteiramente casualizado, sendo quatro tratamentos com quatro repetições de 50 sementes, sendo 200 sementes por tratamento, totalizando 800 sementes por lote.



**FIGURA 2.** Tratamento biológico e químico das sementes de *Pinus taeda*: A e B) Preparo da suspensão de conídios de *Trichoderma* spp. para microbiolização das sementes; C e D) Recobrimento, adição de água e agitação das sementes com fungicida tiofanato metílico + clorotalonil

Foram realizadas avaliações semanais durante 90 dias, contabilizando o número de plântulas saudáveis até a estabilização da emergência para avaliar a velocidade de emergência destas. Após a estabilização da emergência, avaliaram-se as seguintes variáveis: percentagem de plântulas saudáveis, plântulas sintomáticas, plântulas sintomáticas com *Fusarium* spp., número de sementes não germinadas (SNG) e percentagem de SNG com *Fusarium* spp.

As plântulas que apresentaram algum sintoma e as sementes não germinadas foram colocadas em câmara úmida para a observação de estruturas fúngicas. Estes dados foram

analisados através do delineamento de blocos ao acaso, considerando cada lote avaliado um bloco. Os dados da porcentagem de plântulas sintomáticas e plântulas sintomáticas com *Fusarium* spp. foram transformados pela fórmula  $X=\sqrt{x}$ . Foi medida a altura das plântulas sadias após a estabilização de emergência com auxílio de um paquímetro digital a fim de avaliar se houve efeito dos tratamentos no crescimento e desenvolvimento das plântulas.

#### **Análise *in vitro* da microbiolização de sementes de *P. taeda* inoculadas com *Fusarium subglutinans* para controle da podridão de raiz.**

Neste experimento foi repetido o mesmo procedimento que o experimento IV, entretanto as sementes de *P. taeda* foram inoculadas com o isolado L3R2 de *F. subglutinans* que se mostrou mais agressivo no teste de patogenicidade realizado com aqueles isolados de sementes no teste de detecção. Para este teste foram utilizadas as sementes do lote 3.

O isolado L3R2 de *F. subglutinans* foi cultivado em meio BDA em placas de Petri suplementado com 40 ppm de clorafenicol e 80 ppm de ampicilina durante 12 dias em câmara BOD em fotofase de 12 horas e 24 °C. Após este período as sementes de *P. taeda* foram colocadas sobre a superfície das colônias fúngicas nas placas de Petri, totalmente colonizadas pelo *F. subglutinans* e estas permaneceram por 48 horas em BOD nas mesmas condições já mencionadas. Passado este tempo, as sementes inoculadas foram microbiolizadas com os mesmos dois isolados de *Trichoderma* spp., TRB1 e TRB2. O tratamento químico das sementes foi realizado com o tiofanato metílico, idem ao experimento V. As placas de Petri foram incubadas nas mesmas condições já mencionadas no experimento V, e o delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, sendo quatro tratamentos e quatro repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento.

#### **Análise *in vivo* da microbiolização de sementes de *P. taeda* inoculadas com *Fusarium subglutinans* para controle da podridão de raiz.**

Neste experimento foi repetido o mesmo procedimento que o experimento V, no entanto as sementes de *P. taeda* foram inoculadas com o isolado L3R2 de *F. subglutinans*, que se mostrou mais agressivo no teste de patogenicidade realizado com aqueles isolados de sementes no teste de detecção. Para este teste foram utilizadas as sementes do lote 3. O isolado L3R2 foi cultivado em meio BDA em placas de Petri suplementado com 80 ppm de

clorafenicol e 40 ppm de ampicilina durante 12 dias em câmara de incubação BOD em fotofase de 12 horas e 24°C. Após este período, as sementes de *P. taeda* foram colocadas sobre a superfície das colônias fúngicas nas placas de Petri, totalmente colonizadas pelo *F. subglutinans* e estas permaneceram por 48 horas em câmara BOD nas mesmas condições já mencionadas no experimento VI. Passado este tempo, as sementes inoculadas foram microbiolizadas com os mesmos dois isolados de *Trichoderma* spp., TRB1 e TRB2. O tratamento químico das sementes foi realizado com o tiofanato metílico + clorotalonil, idem ao experimento V. Avaliou-se a percentagem de plântulas saudias aos 7, 14, 21 e 28 dias após a semeadura. As plântulas que apresentaram algum sintoma e as sementes não germinadas foram colocadas em câmara úmida para observação de estruturas fúngicas após incubação de sete dias a 25°C.

### **Análise dos dados**

Todos os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa ASSISTAT versão 7.6 (SILVA e AZEVEDO, 2009).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Crescimento micelial em culturas pareadas: *Trichoderma* spp. x *Fusarium* spp.**

Os resultados encontram-se nas Tabelas 2, 3 e Figura 3.

No pareamento dos 12 isolados de *Trichoderma* spp. com o isolado TS2 de *Fusarium* spp., todos os isolados de *Trichoderma* spp. apresentaram antagonismo reduzindo o crescimento micelial do patógeno a valores significativamente menores que a testemunha, exceto o isolado TR106 (Tabela 2). O isolado do antagonista que se destacou exibindo maior percentagem de inibição ao patógeno foi o TRF com 38,4 %, seguido do isolado TR0506 que exibiu 32,06 % de inibição. Os isolados TR2B, TRS, TRB2 e TRC não diferiram entre si quanto ao grau de antagonismo e, também, não foram inferiores aos isolados TRF e TR0506. Os demais isolados TR2A, TRA, TRB1 e TRD também não diferiram entre si e foram superiores ao isolado TRE. Entretanto, foram inferiores aos isolados já citados (Tabela 2).



No pareamento com o isolado TS2 de *Fusarium* sp., a classificação dos isolados de *Trichoderma* spp. quanto ao antagonismo, de acordo com a escala de notas de Bell (1982), variou sendo que as notas oscilaram entre 2,0 e 2,5. Já no pareamento com o isolado TD2, as notas dos isolados de *Trichoderma* spp. variaram entre 1,9 e 2,3. O isolado T106 foi uma exceção, pois recebeu nota 5,0 idem a nota da testemunha quando pareado com os dois isolados de *Fusarium* spp., TS2 e TD2, utilizados no presente experimento (Tabelas 2 e 3). Em pesquisa realizada em *Pinus elliotti*, testando a ação antagônica de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium sambucinum*, conforme a escala de Bell et. al. (1982), relatou uma ocupação de 2/3 da placa pelo antagonista, recebendo nota 2 conforme a escala, aos 7 dias de cultivo (MACIEL, 2012), resultado que ratifica aos encontrados no presente trabalho.

**TABELA 2.** Crescimento micelial de *Fusarium* spp. (isolado TS2) em cultivo pareado com doze isolados de *Trichoderma* spp., percentagem de inibição do antagonista ao crescimento do patógeno e classificação dos isolados quanto ao antagonismo.

| Pareamento<br><i>Fusarium</i> x <i>Trichoderma</i> | Diâmetro médio das colônias de<br><i>Fusarium</i> spp. aos 7 dias <sup>1</sup> | Percentagem de<br>inibição do antagonista | Classificação dos isolados<br>de <i>Trichoderma</i> spp. aos 7 dias <sup>2</sup> |
|--|--|---|--|
| TS2 X T106   | 45,55 a  | -3,22                                     | 4,0  |
| Testemunha   | 44,13 a  | –   | 4,0  |
| TS2 X TRE  | 36,86 b  | 16,47 c                                   | 2,5  |
| TS2 X TRD  | 36,26 bc   | 17,81 bc                                  | 2,5  |
| TS2 X TRB1   | 35,16 bc   | 20,32 bc                                  | 2,3  |
| TS2 X TRA  | 34,58 bc   | 21,64 bc                                  | 2,5  |
| TS2 X TR2A   | 33,98 bc   | 22,99 bc                                  | 2,0  |
| TS2 X TRC  | 32,94 bcd  | 25,35 abc                                 | 2,1  |
| TS2 X TRB2   | 32,23 bcd  | 26,95 abc                                 | 2,0  |
| TS2 X TRS  | 31,55 bcd  | 28,48 abc                                 | 2,5  |
| TS2 X TR2B   | 31,12 bcd  | 29,46 abc                                 | 2,0  |
| TS2 X TRE0506                                      | 29,97 cd   | 32,06 ab                                  | 2,0  |
| TS2 X TRF  | 27,18 d  | 38,4 a                                    | 2,0  |

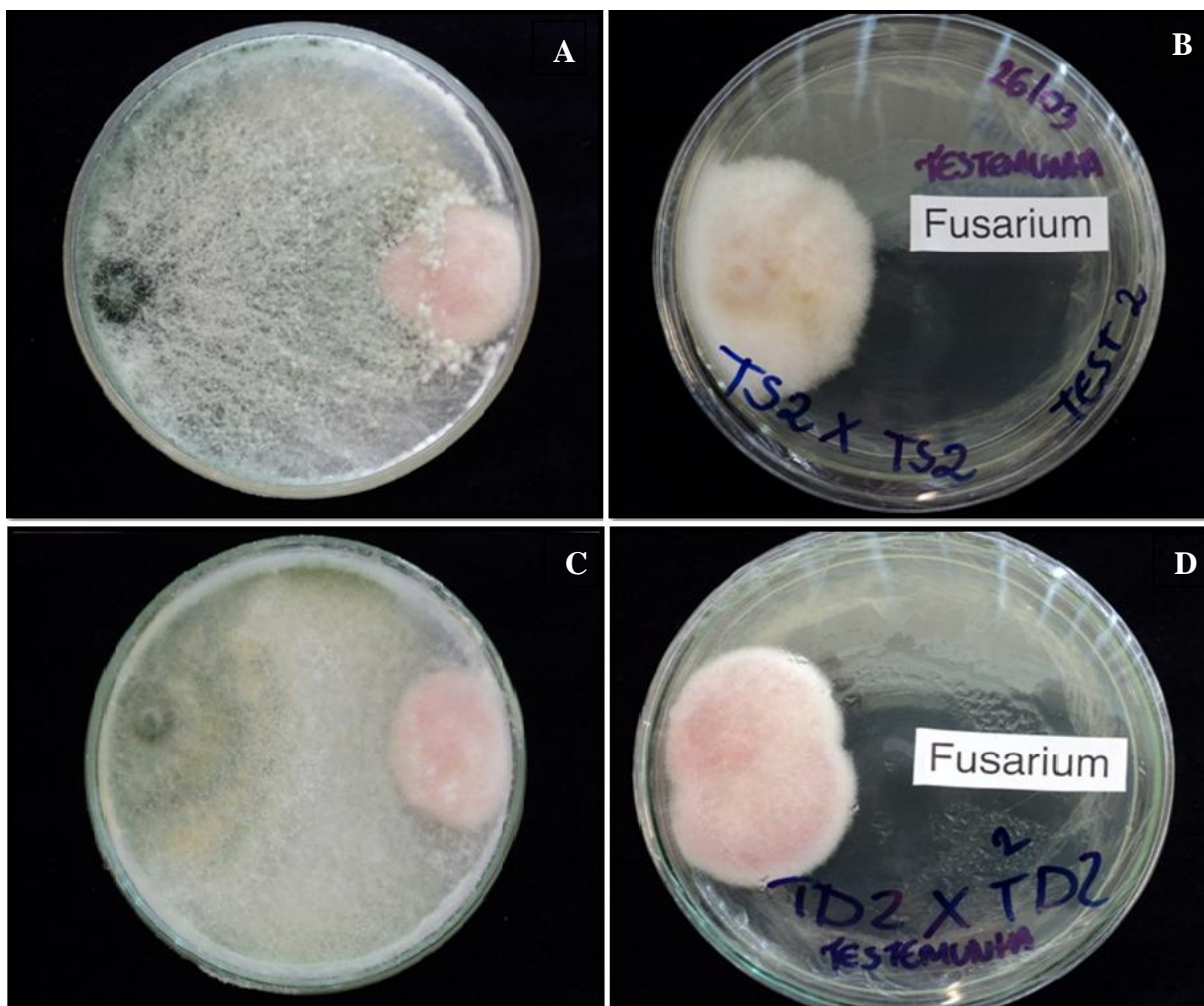
<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; <sup>(2)</sup> Escala de Bell et al., (1982) Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e cobre toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.

No pareamento dos 12 isolados de *Trichoderma* spp. com o isolado TD2 (isolado obtido de raízes de mudas de *P. taeda*) de *Fusarium*, os isolados TRB1, TR0506, TRS, TR2B e TR2A de *Trichoderma* spp. foram superiores a testemunha e ao isolado TR106, exibindo 26,01, 29,84, 30,66, 30,66 e 32,99% de inibição, respectivamente. Entretanto, não foram superiores aos isolados TRE, TRC, TRA, TRF E TRD e estes não foram superiores a testemunha (Tabela 3). O teste do confronto entre fitopatógeno e antagonista encontra-se na Figura 1.

**TABELA 3.** Crescimento micelial de *Fusarium* spp. (isolado TD2) em cultivo pareado com doze isolados de *Trichoderma* spp., percentagem de inibição do antagonista ao crescimento do patógeno e classificação dos isolados quanto ao antagonismo.

| Pareamento<br><i>Fusarium</i> x <i>Trichoderma</i> | Diâmetro médio das colônias de<br><i>Fusarium</i> s pp. aos 7 dias <sup>1</sup> | Percentagem de<br>inibição do antagonista | Classificação dos isolados<br>de <i>Trichoderma</i> spp. aos 7 dias <sup>2</sup> |
|--|---|---|--|
| TD2 X T106   | 41,03 a   | -4,04                                     | 4,0  |
| Testemunha   | 39,44 a   | –   | 4,0  |
| TD2 X TRE  | 34,91 ab  | 11,50 ab                                  | 2,3  |
| TD2 X TRA  | 32,99 ab  | 16,37 ab                                  | 2,0  |
| TD2 X TRD  | 31,98 ab  | 18,91 ab                                  | 2,0  |
| TD2 X TRC  | 31,72 ab  | 19,57 ab                                  | 2,1  |
| TD2 X TRF  | 31,56 ab  | 19,98 ab                                  | 2,3  |
| TD2 X TRB2   | 31,35 ab  | 20,51 a                                   | 2,0  |
| TD2 X TRB1   | 29,18 b   | 26,01a                                    | 1,9  |
| TD2 X TR0506                                       | 27,67 b   | 29,84 a                                   | 2,0  |
| TD2 X TRS  | 27,35 b   | 30,66 a                                   | 2,0  |
| TD2 X TR2B   | 27,35 b   | 30,66 a                                   | 2,0  |
| TD2 X TR2A   | 26,43 b   | 32,99 a                                   | 2,0  |

<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; <sup>(2)</sup> Escala de Bell et al., (1982) Classe 1: *Trichoderma* cresce sobre o patógeno e cobre toda a superfície do meio; Classe 2: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 2/3 da superfície do meio; Classe 3: *Trichoderma* ocupam aproximadamente metade da superfície do meio; Classe 4: *Trichoderma* cresce sobre pelo menos 1/3 da superfície do meio; Classe 5: *Trichoderma* não cresce e o patógeno ocupa toda a superfície da placa.



**FIGURA 3.** Teste de pareamento de culturas (*Trichoderma* x *Fusarium*): A) Pareamento do isolado TRB1 de *Trichoderma* spp. com o isolado TS2 de *Fusarium* spp.; B) Testemunha do isolado TS2; C) Pareamento do isolado TRB2 de *Trichoderma* spp. com o isolado TD2 de *Fusarium* spp.; D) Testemunha do isolado TD2.

Trabalhos realizados por diversos autores corroboram os resultados do presente experimento, comprovando a inibição exercida por *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de diferentes espécies de *Fusarium*. Em trabalho realizado por Louzada et al. (2009), foram identificados 230 isolados como pertencentes ao gênero de *Trichoderma* obtidos em diferentes regiões brasileiras, e destes, 50 isolados inibiram o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium solani*. *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, causador da murcha de fusarium em feijão, também sofreu ação antagônica *in vitro* por isolados de *Trichoderma* spp. (PANDOLFO, 2007).

Além de exercer antagonismo a espécies de *Fusarium*, *Trichoderma* spp. também já foi relatado inibindo outros patógenos de solo. Quando confrontado com isolados de

*Trichoderma* spp., *Rhizoctonia solani*, agente causal da queima-da-bainha em plântulas de arroz, apresentou redução entre 62,5 a 75,4 % do seu crescimento micelial (SILVA, 2010). Estas ações de antagonismo de *Trichoderma* são realizadas através da produção de antibióticos, tais como glitoxina, viridina, trichodermina, suzuczilina, alameticina e dermatina cujas propriedades possuem amplo espectro de ação e, por isso, possuem a capacidade de inibir o desenvolvimento de outros fungos (DENNIS e WEBSTER, 1971). O hiperparasitismo, característico de um dos mecanismos antagonistas de *Trichoderma* spp., está relacionado com a competição por espaço e com demais atividades metabólicas as quais permitem eficiência na atividade hiperparasítica das estruturas de outros fungos (HARMAN, 2000). Entretanto, estes mecanismos de ação são específicos de cepas de cada isolado, hipótese que explica as diferenças relatadas no desempenho dos isolados estudados nesta pesquisa.

### **Metabólitos Voláteis**

Houve efeito da produção de metabólitos voláteis por *Trichoderma* spp. na redução do crescimento micelial de *Fusarium* spp. Os resultados encontram-se na Tabela 4 e Figura 3.

Todos os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste ensaio, quando confrontados com o isolado L3R2 de *F. subglutinans* e TD2 de *Fusarium* sp., diferiram significativamente da testemunha quanto à redução do crescimento micelial de *F. subglutinans* (isolado L3R2) e *Fusarium* spp. (TD2 e TS2) pela produção de compostos voláteis (Tabela 4). Colônias do fitopatógeno atingiram crescimento inferior ao da testemunha, que alcançou mais de 56 e 52 mm de diâmetro quando confrontados com isolados L3R2 de *F. subglutinans* e TD2 de *Fusarium* sp., respectivamente (Tabela 4). Isto significa que os isolados TRB1, TRB2 e TR0506 de *Trichoderma* spp. em estudo produziram compostos tóxicos voláteis capazes de inibir o crescimento micelial destes isolados de *F. subglutinans* e *Fusarium* sp.. As colônias de L3R2 de *F. subglutinans* apresentaram 37,67, 33,41 e 41,15 mm de diâmetro quando confrontadas com colônias de TRB1, TRB2 e TR0506 de *Trichoderma* spp, respectivamente.

Quando confrontados com o isolado TS2 de *Fusarium* sp., somente o isolado TR0506 de *Trichoderma* sp. diferiu da testemunha, reduzindo significativamente o crescimento micelial deste isolado, que foi de 32,65 mm (Tabela 4). Os demais isolados de *Trichoderma* spp. TRB1 e TRB2, não produziram compostos voláteis capazes de causar redução

significativa de *Fusarium* sp. (TS2), apresentando apenas 15,37 e 12,36 % de inibição respectivamente, enquanto que o isolado TR0506 apresentou 33,94 % de inibição (Tabela 4).

A percentagem de inibição do crescimento micelial de *F. subglutinans* e dos dois isolados de *Fusarium* spp. exercidos pela produção de metabólitos voláteis de três isolados de *Trichoderma* spp. estão apresentados na Tabela 4. Na Figura 3 está ilustrado o teste de metabólitos voláteis.

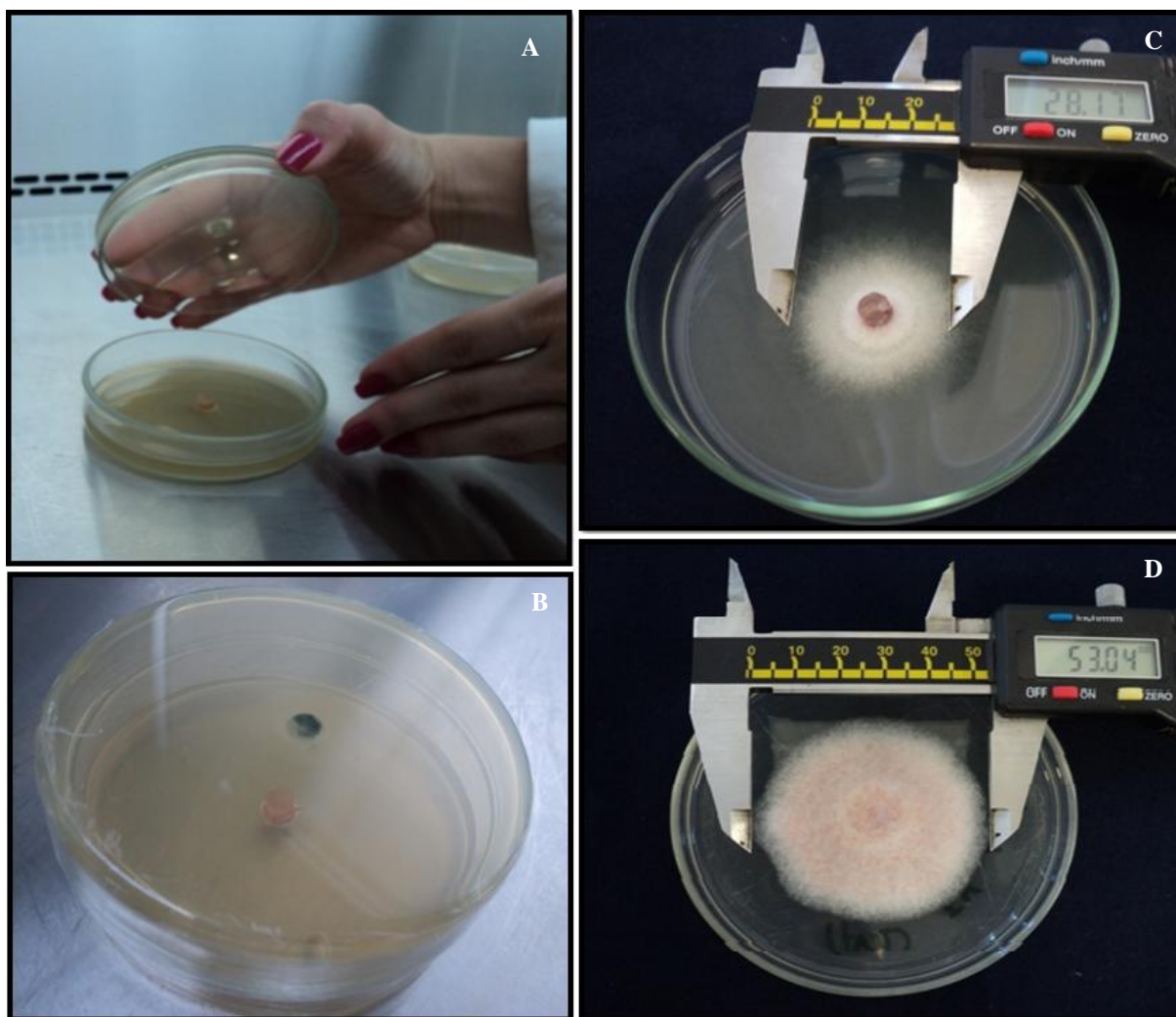
Isolados de *Trichoderma harzianum* foram capazes de exibir ação antifúngica a *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* pela produção de metabólitos voláteis, reduzindo o crescimento do fitopatógeno em até 50 % (CARVALHO et al. 2011), dados que validam o encontrado neste trabalho.

**TABELA 4.** Percentagem de inibição do efeito de metabólitos voláteis de três isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de três isolados de *Fusarium* spp.

| Isolado<br><i>Trichoderma</i> spp. | Isolado<br><i>Fusarium</i>    | Diâmetro de colônia<br>de <i>Fusarium</i> (mm) | Inibição de<br>Metabólitos Voláteis (%) |
|------------------------------------|-------------------------------|--|---|
| TRB1                               | <i>F. subglutinans</i> (L3R2) | 37,67 b <sup>1</sup>                           | 32,93                                   |
| TRB2                               | <i>F. subglutinans</i> (L3R2) | 33,41 b  | 40,25                                   |
| TR0506                             | <i>F. subglutinans</i> (L3R2) | 41,15 b  | 26,74                                   |
| Testemunha <sup>2</sup>            | <i>F. subglutinans</i> (L3R2) | 56,17 a  | -                                       |
| CV (%)                             |                               | 9,35%  |   |
| TRB1                               | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)     | 43,32 b  | 17,05                                   |
| TRB2                               | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)     | 39,86 b  | 23,67                                   |
| TR0506                             | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)     | 42,48 b  | 18,66                                   |
| Testemunha                         | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)     | 52,22 a  | -                                       |
| CV (%)                             |                               | 5,35%  |   |
| TRB1                               | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)     | 41,82 a  | 15,37                                   |
| TRB2                               | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)     | 43,31 a  | 12,36                                   |
| TR0506                             | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)     | 32,65 b  | 33,94                                   |
| Testemunha                         | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)     | 49,42 a  | -                                       |
| CV (%)                             |                               | 9,04%  |   |

<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

<sup>(2)</sup> Sem adição de disco do antagonista na placa correspondente



**FIGURA 4.** Teste de metabólitos voláteis: A) Sobreposição das placas com o antagonista e o patógeno; B) Placas sobrepostas, a de baixo com disco de *Fusarium* spp. e em cima com disco de *Trichoderma* spp. C) Medição da colônia de *Fusarium* spp. com diâmetro reduzido pelo efeito dos metabólitos voláteis; D) Medição da colônia de *Fusarium* spp. não exposta aos metabólitos voláteis (testemunha).

### Metabólitos Não voláteis

Os resultados do efeito da produção de metabólitos não voláteis por isolados de *Trichoderma* spp. encontram-se na Tabela 5.

De acordo com os resultados obtidos, todos os isolados de *Trichoderma* spp. utilizados neste ensaio, diferiram significativamente da testemunha quanto à produção de metabólitos difusíveis no celofane com propriedades inibitórias quando confrontados com o isolado TD2 de *Fusarium* spp. Entretanto, quando confrontado com os demais isolados de *Fusarium* sp.

(TS2) e *F. subglutinans* (L3R2), nenhum dos isolados do agente de biocontrole produziu metabólitos tóxicos deletérios ao crescimento micelial de *Fusarium* spp. (Tabela 5). As Tabelas 4 e 5 mostram que a percentagem de inibição exercida pelos metabólitos não-voláteis, ao crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* spp., é inferior a exercida pelos compostos voláteis, indicando não ser aquela a melhor estratégia dos isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* spp. *in vitro*.

Os mecanismos antagônicos de *Trichoderma* ao desenvolvimento do patógeno geralmente não é único, podendo ocorrer diversas ações paralelas, tais como: antibiose, parasitismo, competição e estímulo à defesa do hospedeiro (BETTIOL, 1991). No presente estudo, é provável que tenha ocorrido antibiose, hiperparasitismo e competição no ponto de encontro entre os micélios do patógeno e antagonista, sendo que *Trichoderma* pode detectar e localizar hifas de fungos suscetíveis, crescendo em sua direção (MELO, 1998)

Os resultados dos testes demonstram que a produção de compostos ditos não voláteis pode ser eficiente na estratégia de biocontrole de alguns fitopatógenos e promissora somente para alguns poucos isolados do antagonista. Entretanto, é importante destacar que os agentes de biocontrole permaneceram apenas três dias incubados sobre o papel celofane, fato que pode ter interferido na qualidade e na quantidade de produção de metabólitos não voláteis tóxicos e deletérios ao crescimento de *Fusarium* spp. Porém, na ocasião já citada, os isolados de *Trichoderma* spp. produziram quantidade suficiente de compostos capazes de inibir o crescimento do isolado TD2 de *Fusarium* sp. Portanto, o nível de controle pode variar a depender do isolado e entre espécies de *Trichoderma* spp. (DENNIS & WEBSTER 1971 a, b), a despeito que a maioria dos agentes empregados no biocontrole de doenças de plantas apresentarem certo grau de especialização.

Os resultados negativos do efeito de metabólitos não voláteis já descritos ratificam aqueles encontrados por Dias (2011) que não verificou redução considerável exercido por *Trichoderma* spp. no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.s. *phaseoli in vitro*. Pedro et al. (2008) também verificaram falta de inibição ao crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f.s. *cubense* desempenhado por 15 isolados de *Trichoderma* spp. no teste de metabólitos não voláteis.

Possíveis causas podem ser levantadas para explicar os resultados obtidos neste experimento, tais como a utilização de diferentes espécies de *Fusarium* spp. e/ou populações diferentes do fungo agente de controle biológico, com diferentes graus de agressividade.



**TABELA 5.** Percentagem de inibição do efeito de metabólitos não voláteis de três isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de três isolados de *Fusarium* spp.

| Isolado<br><i>Trichoderma</i> spp. | Isolado<br><i>Fusarium</i> spp. | Diâmetro de colônias<br>de <i>Fusarium</i> (mm) | Inibição de metabólitos<br>não voláteis (%) |
|------------------------------------|---------------------------------|---|---|
| TRB1                               | <i>F. subglutinans</i> (L3R2)   | 62,17 a   | 0,47  |
| TRB2                               | <i>F. subglutinans</i> (L3R2)   | 56,63 a   | 9,34  |
| TR0506                             | <i>F. subglutinans</i> (L3R2)   | 61,31 a   | 1,85  |
| Testemunha <sup>2</sup>            | <i>F. subglutinans</i> (L3R2)   | 62,46 a   | -   |
| CV (%)                             |                                 | 13,04%  |   |
| TRB1                               | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)       | 75,23 b   | 3,38  |
| TRB2                               | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)       | 72,69 c   | 6,64  |
| TR0506                             | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)       | 72,44 c   | 6,96  |
| Testemunha                         | <i>Fusarium</i> sp. (TD2)       | 77,86 a   | -   |
| CV (%)                             |                                 | 1,46%   |   |
| TRB1                               | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)       | 60,85 a   | 1,46  |
| TRB2                               | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)       | 60,79 a   | 1,56  |
| TR0506                             | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)       | 57,78 a   | 6,42  |
| Testemunha                         | <i>Fusarium</i> sp. (TS2)       | 61,75 a   | -   |
| CV (%)                             |                                 | 4,30%   |   |

<sup>(1)</sup> Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

<sup>(2)</sup> Sem adição de disco do antagonista no celofane sobreposto

### **Análise *in vitro* da microbiolização de sementes de *P. taeda* naturalmente infestadas para controle de *Fusarium* spp.**

O controle de *Fusarium* spp. em condições *in vitro*, através da microbiolização de sementes foi avaliado através da incidência de *Fusarium* spp. nas sementes. Houve efeito da microbiolização na incidência de *Fusarium* spp. Os resultados encontram-se na Tabela 6 e na Figura 5.

As sementes tratadas com *Trichoderma* spp. e fungicida tiofanato metílico + clorotalonil reduziram a incidência de *Fusarium* spp. *in vitro* em todos os lotes de sementes avaliados (Tabela 6). No lote 4, o que apresentou maior incidência de *Fusarium* spp. no teste de detecção, o tratamento com fungicida foi o que mais reduziu a incidência do fitopatógeno nas sementes em relação aos demais tratamentos, apesar do biocontrole ter reduzido a contaminação a níveis significativos quando comparado à testemunha (Tabela 6). Estes



resultados corroboram com os demais dados obtidos neste experimento que comprovam a ação eficaz de *Trichoderma* spp. no controle de *Fusarium* spp. O tratamento químico, neste caso, teve um melhor desempenho em relação aos experimentos realizados *in vivo*. É possível que o fungicida melhore a qualidade sanitária da semente, entretanto este não desempenha influência na promoção de crescimento de plântulas, ou seja, não atua nas propriedades fisiológicas destas, contrariamente a ação de *Trichoderma* spp. que promove comprovadamente incremento no crescimento vegetativo de diversas espécies já citadas.

**TABELA 6.** Percentual da incidência média (%) de *Fusarium in vitro* em três lotes de sementes de *Pinus taeda* sob tratamentos com *Trichoderma* spp. e fungicida.

| Tratamento  | Incidência média de <i>Fusarium</i> (%) |                                    |                                   |
|-------------|---|------------------------------------|-----------------------------------|
|             | <sup>1</sup> Lote baixa incidência      | <sup>2</sup> Lote média incidência | <sup>3</sup> Lote alta incidência |
| TRB1*       | 10,00 b                                 | 10,00 b                            | 67,50 a                           |
| TR0506*     | 10,00b                                  | 19,50 b                            | 60,00 b                           |
| Fungicida** | 11,00 b                                 | 16,00 b                            | 44,00 c                           |
| Testemunha  | 37,50 a                                 | 63,50 a                            | 98,50 a                           |
| CV%         | 39,28                                   | 25,91                              | 9,88                              |

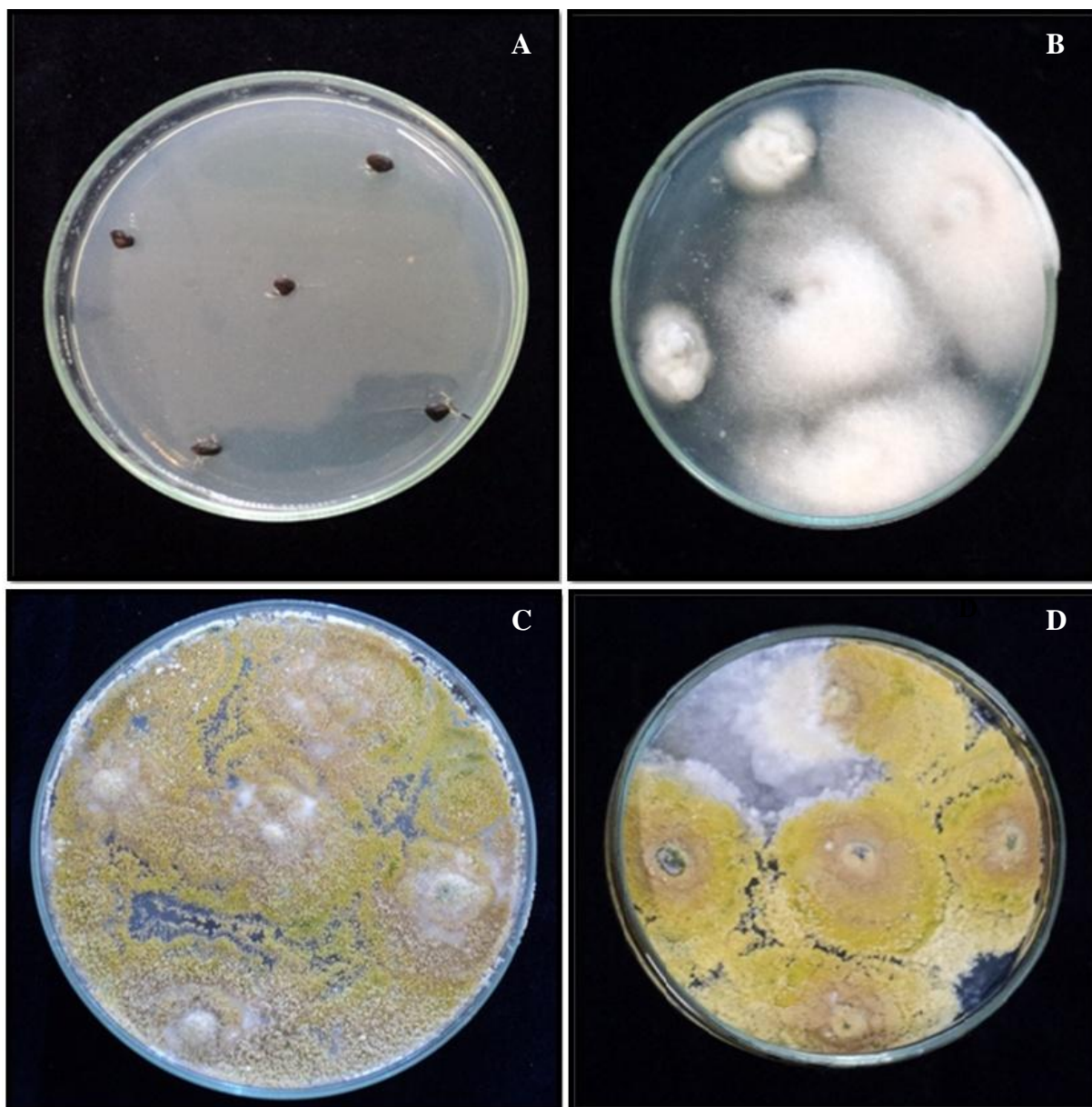
<sup>1</sup> Lote 2: 12% de incidência de *Fusarium*

<sup>2</sup> Lote 11: 49% de incidência de *Fusarium*

<sup>3</sup> Lote 4: 94% de incidência de *Fusarium*

\* Isolados de *Trichoderma* spp.

\*\* Fungicida: tiofanato metílico + clorotalonil



**FIGURA 5.** Teste de microbiolização *in vitro* de sementes de *Pinus taeda*: A) Sementes de *P. taeda* tratadas com tiofanato metílico + clorotalonil; B) Sementes de *P. taeda* não tratadas; C e D) Sementes de *P. taeda* microbiolizadas com *Trichoderma* spp.

**Análise *in vivo* da microbiolização de sementes de *P. taeda* naturalmente infestadas para controle de *Fusarium* spp.**

O controle de *Fusarium* spp. em condições *in vivo*, através da microbiolização das sementes, foi avaliado considerando-se três análises: velocidade de emergência; ocorrência da doença através da porcentagem das variáveis plântulas saudáveis, plântulas sintomáticas, plântulas sintomáticas com *Fusarium* spp., sementes não-germinadas (SNG) e SNG com

*Fusarium*; e altura das plântulas. Houve efeito da microbiolização das sementes em condições *in vivo* no aumento da velocidade de emergência, percentual de plântulas saudáveis e altura de plântulas. Os resultados encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9. Os sintomas da doença observados durante as avaliações estão ilustrados nas Figuras 6 e 7.

A velocidade de emergência das plântulas do lote 2 (baixa incidência de *Fusarium* spp.) foi maior nos tratamentos em que as sementes foram microbiolizadas com os dois isolados de *Trichoderma* spp. (Tabela 7), com destaque para o isolado TRB1 que se diferenciou significativamente das demais formas de controle ao longo das avaliações, ou seja, foi o isolado que melhor condicionou a velocidade de emergência das plântulas de *P. taeda* até a sua estabilização. O tratamento TR0506 diferiu na maioria das avaliações da testemunha e do tratamento químico, entretanto foi inferior ao tratamento TRB1. As sementes tratadas com o fungicida não obtiveram emergência diferente da testemunha em nenhum momento das avaliações.

No lote 4 (alta incidência de *Fusarium*) o tratamento TRB1 se destacou inicialmente na promoção da velocidade de emergência em relação aos demais, inclusive ao outro tratamento com *Trichoderma* spp. TR0506. No entanto, em meados das avaliações o tratamento TR0506 se igualou ao tratamento TRB1, da mesma forma que a emergência das plântulas tornou-se uniforme em todos os tratamentos, incluindo o químico e a testemunha ao final das avaliações. No lote 11 (média incidência de *Fusarium* spp.) houve, inicialmente, nas duas primeiras semanas de avaliação, maior velocidade de emergência das plântulas cujas sementes foram tratadas com o isolado TR0506 de *Trichoderma* spp. Após este período, os tratamentos de biocontrole e controle químico não diferiram entre si, entretanto a emergência das plântulas foi mais veloz em todo o período de avaliação comparada à emergência das plântulas do tratamento controle. Os dados dos três meses de avaliação estão descritos na Tabela 8.

Em pesquisa realizada por Machado (2012) foi verificada a influência positiva de isolados de *Trichoderma harzianum* na velocidade de emergência de plântulas de *Gochnatia polymorpha* em relação ao tratamento controle. Oliveira (2007) tratando sementes de cártamo (*Cartamus tinctorius*) com *Trichoderma* spp., o isolado TC 1.15 proporcionou maior índice de velocidade de emergência das plântulas.

**TABELA 7.** Velocidade de emergência de plântulas oriundas de sementes de *Pinus taeda* naturalmente infestadas com *Fusarium* e tratadas com *Trichoderma* spp. e tiofanato metílico + clorotalonil.

| Lote <sup>1</sup> | Dias após a semeadura                            |          |          |          |          |          |
|-------------------|--|----------|----------|----------|----------|----------|
|                   | 14   | 21       | 28       | 35       | 42       | 49       |
| Baixa incidência  | Número de plântulas de <i>P. taeda</i> emergidas |          |          |          |          |          |
| TRB1*             | 16,25 a <sup>2</sup>                             | 25,50 a  | 31,25 a  | 36,00 a  | 39,25 a  | 41,25 a  |
| TR0506*           | 13,00 b  | 23,25 ab | 26,75 ab | 30,75 ab | 34,00 ab | 35,25 ab |
| Fungicida**       | 4,50 c   | 17,25 bc | 21,25 b  | 23,75 bc | 29,00 b  | 30,50 b  |
| Testemunha        | 5,50 c   | 15,50 c  | 20,25 b  | 21,75 c  | 25,75 b  | 30,25 b  |
| CV%               | 9,65   | 16,85    | 17,94    | 14,26    | 12,93    | 10,48    |
| Média incidência  | 14   | 21       | 28       | 35       | 42       | 49       |
| TRB1              | 4,75 b   | 16,75 b  | 26,50 a  | 30,00 a  | 37,00 a  | 39,75 a  |
| TR0506            | 12,00 a  | 25,00 a  | 30,25 a  | 33,75 a  | 40,50 a  | 41,75 a  |
| Fungicida         | 12,00 a  | 24,00 a  | 30,75 a  | 33,00 a  | 36,25 a  | 38,00 a  |
| Testemunha        | 3,25 b   | 9,00 c   | 13,75 b  | 17,00 a  | 20,50 b  | 22,75 b  |
| CV%               | 19,6   | 17,39    | 12,97    | 13,57    | 13,73    | 11,14    |
| Alta incidência   | 14   | 21       | 28       | 35       | 42       | 49       |
| TRB1              | 8,50 a   | 19,00 a  | 22,25 a  | 24,00 a  | 26,75 a  | 27,50 ab |
| TR0506            | 3,00 b   | 12,75 b  | 18,50 a  | 21,25 a  | 26,75 a  | 29,25 a  |
| Fungicida         | 1,50 b   | 8,00 b   | 10,75 b  | 17,50 ab | 25,00 a  | 27,75 ab |
| Testemunha        | 1,25 b   | 7,00 b   | 11,25 b  | 13,25 b  | 18,50 a  | 20,25 b  |
| CV%               | 23,97  | 25,04    | 21,24    | 17,22    | 17,02    | 15,56    |

<sup>1</sup> Baixa incidência: Lote 2 com 12% de incidência de *Fusarium*; Média incidência: Lote 11 com 49% de incidência *Fusarium*;

Alta incidência: Lote 4 com 94% de incidência de *Fusarium*

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade

\* Isolados de *Trichoderma* spp.

\*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil

Nota-se que os tratamentos tiveram comportamentos distintos em cada lote de semente. Isto se deve ao fato das sementes de cada um dos lotes apresentarem variações na qualidade fisiológica. A exemplo do isolado TRB1 de *Trichoderma* sp., que foi o melhor tratamento nos lotes 2 e 4, todavia no lote 11 o tratamento que proporcionou a melhor velocidade de emergência inicialmente aos 14 dias foi o TR0506. Ao final das avaliações (49 dias após a semeadura), o tratamento TR0506 proporcionou maior número de plântulas emergidas nos lotes de média e alta incidência (lotes 11 e 4) de *Fusarium* spp.

O lote 2 foi o que apresentou menor incidência de *Fusarium* spp. no teste de detecção, porém, dentre os três lotes trabalhados neste experimento, foi o lote de pior qualidade fisiológica, apresentando somente 51 % de germinação. Todavia, o lote 4 é o de melhor qualidade fisiológica dentre os três, exibindo 88 % de germinação. Em contrapartida, este lote

mostrou ser o de pior qualidade sanitária, apresentando 94 % de incidência de *Fusarium* spp. O lote 11 mostrou qualidade sanitária e fisiológica intermediária dentre os três lotes de sementes estudados, com 49 e 61% respectivamente. Estes dados podem explicar o desempenho particular de cada um dos tratamentos aplicados aos três diferentes lotes de sementes de *P. taeda*. Em pesquisas realizadas por Mastouri et al. (2010), Shores et al. (2010) e Harman (2011), demonstram a capacidade de *Trichoderma* spp. na melhoria do vigor de sementes de baixa qualidade, fato que explica o desempenho dos isolados utilizados neste experimento ter influenciado positivamente o desenvolvimento das plântulas do lote 2 cujas sementes apresentaram baixa qualidade fisiológica.

Em pesquisa feita por Golle (2007) foi demonstrado que a variável percentagem de plântulas normais (germinação) é eficiente para selecionar lotes de sementes de *Pinus taeda* com qualidade fisiológica superior. A variação de controle exercido por *Trichoderma* spp. pode variar em função do isolado e das condições bióticas e abióticas específicas, dentro e entre espécies de *Trichoderma* spp. (DENNIS e WEBSTER 1971a) condicionando, desta maneira, melhores condições de desenvolvimento inicial das plântulas e, conseqüentemente, afetando a velocidade de emergência.

Pesquisas com sementes agrícolas revelam que a qualidade fisiológica das sementes afeta o desenvolvimento destas. A velocidade de emergência mostrou um retardamento na emergência das plântulas de arroz, quando foram usadas sementes de menor qualidade fisiológica (HOFS et al., 2004). Lotes de sementes de feijão mais vigorosas produziram maior emergência a campo e índice de velocidade de emergência (LUDWIG et al., 2008).

Os tratamentos de biocontrole das sementes aumentaram a percentagem de plântulas sadias em relação à testemunha e o controle químico não diferiu da testemunha e dos tratamentos com *Trichoderma* spp. Entretanto, não houve diferença entre os lotes de sementes avaliados para esta variável. Já o percentual de plântulas sintomáticas só foi reduzido significativamente pelo tratamento com fungicida e aquele foi homogêneo entre os lotes. Porém, depois de incubadas em câmara úmida, o percentual de plântulas sintomáticas que apresentaram sinais de *Fusarium* spp. não diferiram entre os tratamentos, apesar da testemunha ter apresentado numericamente maior percentual de plântulas com sinais do fitopatógeno. Todavia, esta variável apresentou menor percentagem no lote 2, dado que corrobora a menor incidência de *Fusarium* spp. relatada no teste de detecção em relação aos demais lotes de sementes avaliados.

O número de sementes não germinadas (SNG) foi superior no lote 4, uma vez que este lote se mostrou o de pior qualidade sanitária no teste de detecção. As sementes microbiolizadas com os dois isolados de *Trichoderma* spp. (TRB1 e TR0506) e tratadas com tiofanato metílico germinaram em maior número quando comparado com as sementes não tratadas, porém somente as sementes que receberam biocontrole diferiram estatisticamente da testemunha. O percentual de SNG que apresentaram esporulação de *Fusarium* spp. diferiu entre os lotes, sendo o lote 2 o que apresentou menor incidência de SNG contaminadas com o fitopatógeno. Este lote foi o menos contaminado por *Fusarium* spp. no teste de detecção com 12 % de incidência, comparado com os demais lotes 11 e 4 que apresentaram 38 e 92 % respectivamente de incidência de *Fusarium* spp.

Houve efeito significativo dos tratamentos de biocontrole e químico na redução do percentual de SNG infectadas com o fitopatógeno. Porém o tratamento com o isolado TR0506 não diferiu da testemunha, apesar das sementes tratadas apresentarem numericamente menor percentual de SNG com *Fusarium* spp. (Tabela 8). Em sementes de *Pinus elliotti* microbiolizadas com Agrotich Plus®, formulação comercial a base de *Trichoderma* spp., apresentaram resultados positivos com relação ao vigor plântulas (MACIEL, 2012).

Um dos mecanismos de ação de *Trichoderma* spp. é a competição por substrato quando este está em contato com outros patógenos e isto ocorre pela rápida multiplicação deste antagonista suprimindo o desenvolvimento do fitopatógeno (BETTIOL, 1991). Agrios (2005) sugere que microrganismos agentes de controle biológico ou antagonistas podem agir de modo a aumentar a resistência da planta na presença de patógenos. Estas constatações podem explicar os resultados obtidos neste experimento, em que as sementes previamente microbiolizadas com *Trichoderma* spp. apresentaram melhor desenvolvimento de plântulas quando comparadas as sementes que não receberam tratamento.

**TABELA 8.** Percentual de plântulas sadias, plântulas sintomáticas, plântulas sintomáticas com *Fusarium*, sementes não germinadas (SNG) tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. e tiofanato metílico + clorotalonil, e SNG com *Fusarium* sob quatro tratamentos em três lotes de sementes de *Pinus taeda*.

| Lote <sup>1</sup> | Plântulas (%)        |                     |                                  |          |                             |
|-------------------|----------------------|---------------------|----------------------------------|----------|-----------------------------|
|                   | Sadias               | Sintomáticas        | Sintomáticas com <i>Fusarium</i> | SNG      | SNG com <i>Fusarium</i> (%) |
| Baixa incidência  | 63,38 a <sup>2</sup> | 2,36 a <sup>x</sup> | 1,66 b <sup>x</sup>              | 15,31 b  | 16,50 b                     |
| Média incidência  | 61,25 a              | 3,59 a              | 5,35 a                           | 11,50 b  | 33,95 a                     |
| Alta incidência   | 48,50 a              | 2,68 a              | 5,82 a                           | 22,31 a  | 21,35 ab                    |
| Tratamento        | Sadias               | Sintomáticas        | Sintomáticas com <i>Fusarium</i> | SNG      | SNG com <i>Fusarium</i> (%) |
| TRB1*             | 64,66 a              | 3,15 ab             | 2,85 a                           | 12,58 b  | 19,52 b                     |
| TR0506*           | 65,00 a              | 2,72 ab             | 3,41 a                           | 13,66 b  | 24,05 ab                    |
| Fungicida**       | 61,50 ab             | 1,73 b              | 4,65 a                           | 17,75 ab | 11,73 b                     |
| Testemunha        | 39,66 b              | 3,92 a              | 6,19 a                           | 21,50 a  | 40,44 a                     |
| CV%               | 14,04                | 22,46               | 37,88                            | 13,91    | 24,94                       |

<sup>1</sup> Baixa incidência: Lote 2 com 12% de incidência de *Fusarium*; Média incidência: Lote 11 com 49% de incidência *Fusarium*; Alta incidência: Lote 4 com 94% de incidência de *Fusarium*

<sup>2</sup> Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

<sup>x</sup> Dados transformados pela fórmula  $X=\sqrt{x}$

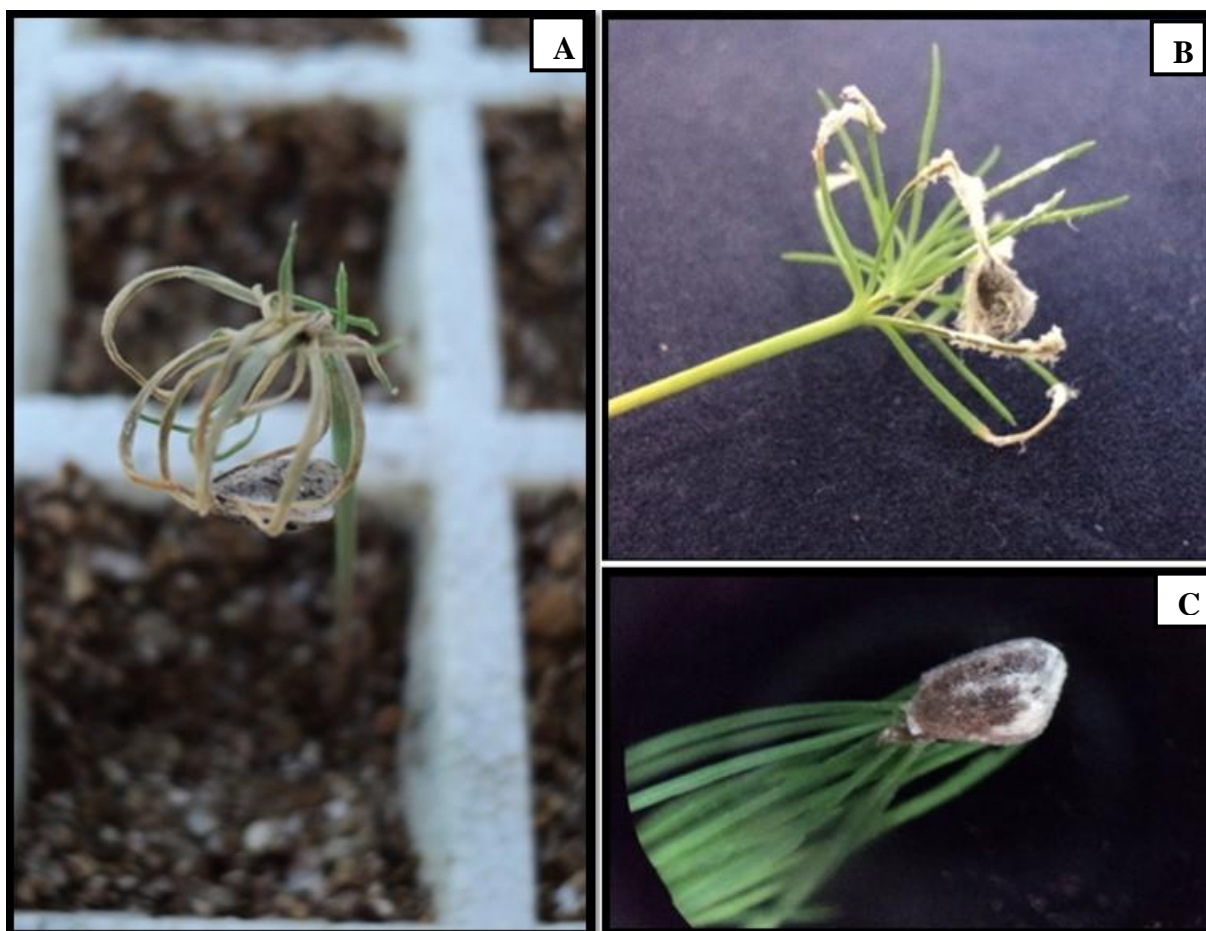
\* Isolados de *Trichoderma* spp.

\*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil



**FIGURA 6.** Sintomas da podridão de raiz em plântula de *Pinus taeda* causada por *Fusarium subglutinans*: A) Lesões no colo, murcha e morte da parte aérea; B) Lesão necrótica no hipocótilo; C) Lesão necrótica na radicela e sinais de *F. subglutinans*.





**FIGURA 7.** Sintomas de podridão de raiz e sinais de *Fusarium subglutinans* em plântulas de *Pinus taeda*: A) Podridão e murcha das acículas; B) Sinais de *F. subglutinans* nas acículas; C) Sinais de *F. subglutinans* na semente de *Pinus taeda*.

A altura das plântulas foi significativamente maior nos tratamentos com biocontrole no lote 2 em relação a testemunha. O controle químico não diferiu do tratamento controle. No lote 4 apenas as sementes tratadas com o isolado TRB1 de *Trichoderma* spp. apresentaram maior altura de plântulas significativa em relação aos demais tratamentos. No lote 11 somente as sementes tratadas com fungicida exibiram maior altura de plântulas comparadas com o biocontrole e a testemunha (Tabela 9). Esta variação entre os tratamentos e os lotes de sementes avaliados pode ser atribuída à diferença na qualidade fisiológica e sanitária das sementes, principalmente a incidência de patógenos nas sementes.

A Tabela 9 mostra que as sementes microbiolizadas do lote 2 (baixa incidência de *Fusarium*) proporcionaram maior altura de plântulas comparadas as sementes que receberam o mesmo tratamento biológico nos lotes 4 e 11, alta e média incidência de *Fusarium* respectivamente. A melhor hipótese para explicar estes resultados é que os mecanismos

envolvidos no aumento do crescimento e do rendimento, induzidos por espécies de *Trichoderma*, aparentemente são o controle de patógenos secundários, que diminuem o crescimento, a atividade das raízes e a produção de fatores estimulantes de crescimento (SANTOS, 2006), já que as plântulas do lote 2 que exibiram maiores alturas, originaram-se de sementes de pior qualidade fisiológica, fator já discutido anteriormente.

Segundo Baugh e Escobar (2007), a ação de *Trichoderma* spp. como estimulador da germinação e do crescimento vegetal é complexa e realizada por interações com fatores bioquímicos e produção de diversas enzimas e compostos benéficos. Vários estudos citam o efeito positivo de *Trichoderma* spp. no crescimento de plântulas. As sementes de nabo forrageiro, que receberam tratamento com Agrotrich®, proporcionaram maior altura de plântulas devido ao produto conter *Trichoderma* spp. que atua como promotor de crescimento de plantas (ETHUR et al., 2006). Sementes de tomateiro tratadas com *Trichoderma* spp. apresentaram comprimento de plântulas superiores as sementes não tratadas (MONTALVÃO, 2012). Em trabalho realizado por Dias (2011), sementes de alface microbiolizadas com isolado T-07 de *Trichoderma* spp. proporcionou um aumento na altura de comprimento de caule de 30,5%. *Trichoderma harzianum* promoveu maiores alturas de plântulas de *Gochnatia polymorpha* (MACHADO, 2012).

**TABELA 9.** Altura de plântulas (mm) de *Pinus taeda* sob quatro tratamentos em três lotes de sementes tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. e tiofanato metílico + clorotalonil.

| Altura de plântulas de <i>Pinus taeda</i> (mm) |                   |                  |                 |
|--|-------------------|------------------|-----------------|
| Tratamento                                     | Lote <sup>1</sup> |                  |                 |
|  | Baixa incidência  | Média incidência | Alta incidência |
| TRB1   | 85,38 a           | 74,05 b          | 80,65 a         |
| TR0506   | 85,64 a           | 77,41 ab         | 76,73 ab        |
| Fungicida                                      | 81,12 ab          | 83,33 a          | 77,18 ab        |
| Testemunha                                     | 77,29 b           | 70,01 b          | 73,37 b         |
| CV (%)   | 2,80              | 4,74             | 2,70            |

<sup>1</sup> Baixa incidência: Lote 2 com 12% de incidência de *Fusarium*; Média incidência: Lote 11 com 49% de incidência *Fusarium*;

Alta incidência: Lote 4 com 94% de incidência de *Fusarium*

<sup>2</sup> Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade

\* Isolados de *Trichoderma* spp.

\*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil

### **Análise *in vitro* da microbiolização de sementes de *P. taeda* inoculadas com *Fusarium subglutinans* para controle da podridão de raiz.**

O controle de *Fusarium* spp. em condições *in vitro*, através da microbiolização de sementes foi avaliado através da incidência de *Fusarium* spp. nas sementes. Não houve efeito da microbiolização *in vitro* de sementes de *P. taeda* previamente inoculadas com *F. subglutinans* na redução da incidência de *Fusarium* spp. Os resultados encontram-se na Tabela 10.

Com a inoculação das sementes de *P. taeda* com *F. subglutinans* antes de serem devidamente tratadas e incubadas *in vitro* em meio seletivo (para crescimento de *Fusarium*), não houve nenhum efeito de tratamento. O fitopatógeno teve crescimento abundante sobre as sementes tratadas (Tabela 10). É provável que a inoculação das sementes antes do tratamento potencializou o inoculo de *Fusarium* fazendo com que o biocontrole e o tratamento com fungicida tiofanato metílico + clorotalonil não apresentassem nenhum efeito inibitório sobre o crescimento micelial do fitopatógeno.

**TABELA 10.** Incidência média (%) de *Fusarium* spp. *in vitro* em sementes de *Pinus taeda* do lote 3 (inoculadas previamente com *Fusarium subglutinans*) tratadas com isolados de *Trichoderma* spp. e com tiofanato metílico + clorotalonil.

| Tratamento  | Incidência média (%) |
|-------------|----------------------|
| TRB1*       | 9,75 a <sup>1</sup>  |
| TRB2*       | 10,00 a              |
| Fungicida** | 9,60 a               |
| Testemunha  | 10,00 a              |
| CV (%)      | 3,56                 |

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

\* Isolados de *Trichoderma* spp.

\*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil

### **Análise *in vivo* da microbiolização de sementes de *P. taeda* inoculadas com *Fusarium subglutinans* para controle da podridão de raiz.**

Os resultados da microbiolização *in vivo* das sementes de *P. taeda* inoculadas encontram-se na Tabela 11 e 12.

Quando as sementes foram inoculadas com *F. subglutinans*, antes de receberem tratamento, houve efeito somente do tratamento químico na velocidade de emergência inicialmente aos sete dias de avaliação após a semeadura. Nos demais dias avaliados, não houve diferença dos tratamentos e a velocidade de emergência foi homogênea (Tabela 11).

As sementes utilizadas neste experimento são do lote 3 as quais diferem na qualidade fisiológica quando comparadas as sementes do lote 2, lote 4 e lote 11 utilizados nos experimentos anteriores em que foi considerado inoculo natural já existente nas sementes. Somando-se este fato com a época de semeadura das sementes do lote 3, quando a temperatura já era mais favorável à germinação e emergência das plântulas, pode-se explicar a rapidez na emergência quando comparamos com os outros lotes de sementes avaliados. Talvez, as sementes do lote 3 possam ter sido dispersas pela planta matriz em estágios de dormência semelhantes, fato que possibilitou uma maior regularidade da emergência das plântulas em todos os tratamentos (FOWLER e BIANCHETTI, 2000).

**TABELA 11.** Velocidade de emergência de plântulas oriundas de sementes de *Pinus taeda* inoculadas com *Fusarium* e tratadas com *Trichoderma* spp. e tiofanato metílico + clorotalonil.

| Lote 3      | Dias após a semeadura |         |         |         |
|-------------|-----------------------|---------|---------|---------|
|             | 7                     | 14      | 21      | 28      |
| TRB1*       | 7,75 ab <sup>1</sup>  | 42,25 a | 45,00 a | 45,00 a |
| TRB2*       | 7,25 ab               | 38,75 a | 44,50 a | 44,75 a |
| Fungicida** | 10,00 a               | 39,75 a | 45,25 a | 45,50 a |
| Testemunha  | 5,00 b                | 41,25 a | 47,00 a | 46,50 a |
| CV%         | 18,66                 | 9,75    | 3,69    | 3,85    |

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade

\* Isolados de *Trichoderma* spp.

\*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil

Houve efeito significativo do biocontrole e controle químico na redução do percentual de plântulas sintomáticas. O tratamento das sementes com tiofanato metílico + clorotalonil reduziu o percentual de SNG com *Fusarium*. Não houve efeito de tratamento na diminuição do percentual de plântulas sadias e de plântulas sintomáticas com *Fusarium* que foi de 100 % em todos os tratamentos. Acredita-se que esta contaminação generalizada com o fitopatógeno tenha ocorrido em função da prévia inoculação com o isolado L3R2 de *F. subglutinans* nas sementes. (Tabela 12).

**TABELA 12.** Percentual de plântulas saudáveis, plântulas sintomáticas, plântulas sintomáticas com *Fusarium*, sementes não germinadas (SNG) e SNG com *Fusarium* sob quatro tratamentos em um lote de sementes (previamente inoculadas com *Fusarium subglutinans*) de *Pinus taeda*.

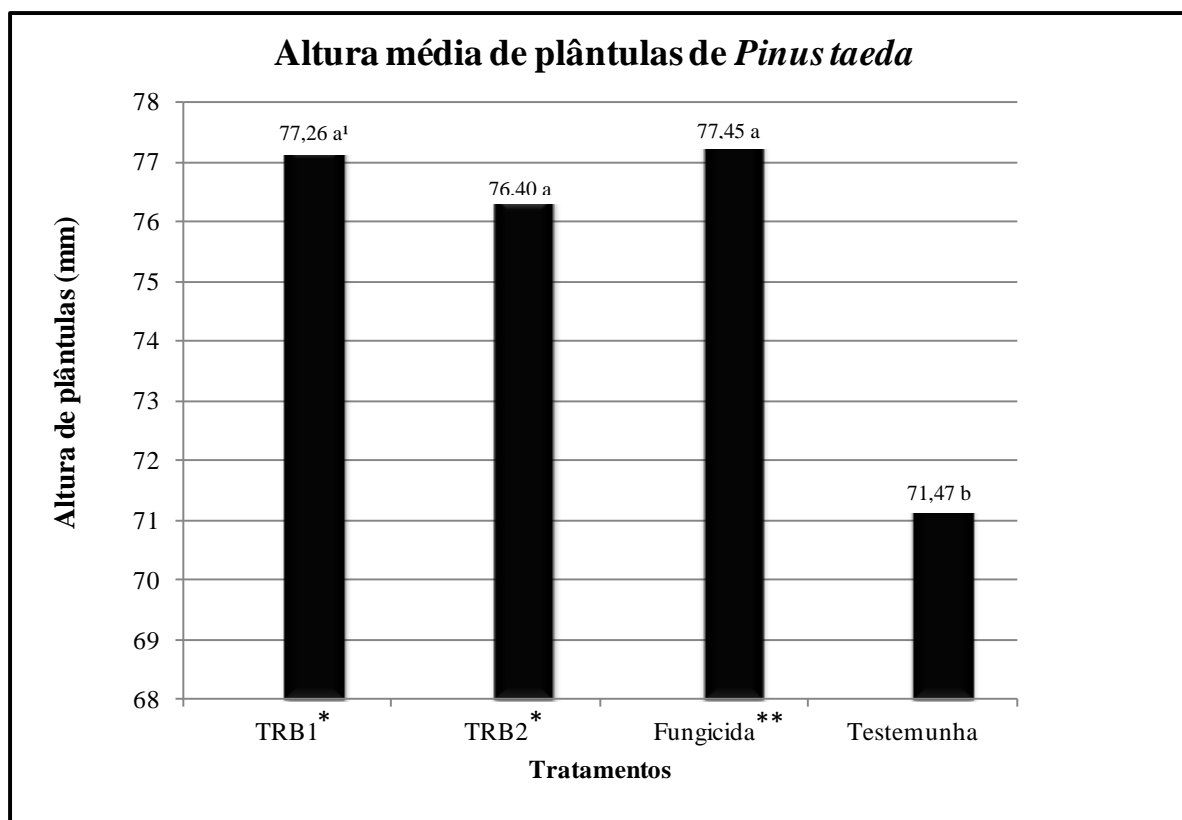
| Tratamento  | Plântulas (%)        |              |                                  |        |                             |
|-------------|----------------------|--------------|----------------------------------|--------|-----------------------------|
|             | Saudáveis            | Sintomáticas | Sintomáticas com <i>Fusarium</i> | SNG    | SNG com <i>Fusarium</i> (%) |
| TRB1*       | 72,00 a <sup>1</sup> | 15,00 b      | 100 a                            | 6,50 a | 58,75 ab                    |
| TRB2*       | 72,00 a              | 12,50 b      | 100 a                            | 6,75 a | 57,70 ab                    |
| Fungicida** | 76,00 a              | 10,00 b      | 100 a                            | 4,50 a | 53,21 b                     |
| Testemunha  | 67,50 a              | 23,50 a      | 100 a                            | 7,00 a | 77,50 a                     |
| CV%         | 10,43                | 25,82        | 0                                | 25,87  | 17,65                       |

<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade

\* Isolados de *Trichoderma* spp.

\*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil

O tratamento das sementes com os dois isolados de *Trichoderma* spp. e o fungicida tiofanato metílico + clorotalonil promoveram maior crescimento das plântulas, uma vez que estas apresentaram alturas superiores quando comparada as plântulas do tratamento controle (Figura 8). Estes resultados se assemelham com os dados obtidos anteriormente no experimento *in vivo*, em que as sementes não foram inoculadas com o fitopatógeno antes de serem tratadas. Isto comprova que, mesmo existindo uma maior pressão de inóculo nas sementes, o biocontrole e controle químico influenciaram positivamente a altura das plântulas em relação à testemunha.



**FIGURA 8.** Altura média de plântulas de *Pinus taeda* do lote 3 de sementes (previamente inoculadas com *Fusarium subglutinans*) em quatro tratamentos.<sup>1</sup> Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey a 5 % de probabilidade. \* Isolados de *Trichoderma* spp. \*\* Fungicida tiofanato metílico + clorotalonil.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, é possível concluir:

- A maioria dos isolados de *Trichoderma* spp., inibiram o crescimento micelial *in vitro* de *Fusarium* spp., exceto o isolado T106.
- Houve efeito da produção de metabólitos voláteis por todos os isolados de *Trichoderma* spp. na redução do crescimento micelial de *Fusarium* spp.
- Quanto à produção de metabólitos não voláteis, só houve efeito quando os isolados de *Trichoderma* spp. foram confrontados com o isolado TD2 de *Fusarium* spp.
- A microbiolização *in vitro* das sementes de *P. taeda* com *Trichoderma* spp. e o tratamento com tiofanato metílico + clorotalonil diminuíram a incidência de *Fusarium* spp. em sementes de *P. taeda*.

- A microbiolização *in vivo* com *Trichoderma* spp. de sementes de *P. taeda* contaminadas com *Fusarium* spp. proporcionou maior velocidade de emergência de plântulas, maior percentual de plântulas saudáveis (PS), menor percentual de sementes não germinadas (SNG) e de SNG com *Fusarium* spp.
- O crescimento das plântulas cujas sementes foram tratadas com fungicida e microbiolizadas com *Trichoderma* spp. apresentou maior altura ao final dos 60 dias de avaliação.
- Em condições de inoculação artificial das sementes com *Fusarium* spp., não houve efeito da microbiolização *in vitro* das sementes de *P. taeda* na redução da incidência de *Fusarium* spp.
- Em condições *in vivo*, só houve efeito positivo da microbiolização de sementes com *Trichoderma* spp. na diminuição do percentual de PS e SNG com *Fusarium* spp.

## REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th Ed. Amsterdam. Elsevier Academic, 2005, 922 p.
- BAKER, J. B.; LANGDON, O. G. **Silvics of North America** Vol. 1 Coníferas: *Pinus taeda* L. Loblolly pine. USA Department of Agriculture and Forest Service. 1990. p. 654.
- BAUGH, C. L.; ESCOBAR, C. L. B. The genus *Bacillus* and genus *Trichoderma* for agricultural bio-augmentation. **Rice Farm Magazine**. Feb., 2007.
- BELL, D.K., WELLS, H.D., MARKHAM, C.R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. **Phytopathology**, v.72,n.4, p.379-382, 1982.
- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. (Boletim Técnico, n.5).Brasília: Embrapa, 1991. p.1-5.
- CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; JÚNIOR, M. L.; SILVA, M. C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, vol. 36, 1, 028-034 (2011)
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. 1971a. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. **T. Brit. Mycol. Soc.** 57(1):25-39.
- DIAS, P. P. **Controle Biológico de fitopatógenos de solo por meio de isolados de fungos do gênero *Trichoderma* e sua contribuição para o crescimento de plantas**. Tese de Doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro- RJ, 2011.
- EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 62, n. 7, p. 42 - 44, 1971.
- ETHUR, L. Z. **Avaliação de fungos como antagonistas para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary em pepineiro cultivado em estufa**. 2002. 155f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2002.
- ETHUR, L. Z.; ROCHA, E. K.; MILANESI, P.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Sanidade de sementes e emergência de plântulas de nabo forrageiro, avia preta e centeio submetidas a tratamentos com bioprotetor e fungicida. **Ciência e Natura**, UFSM, 28 (2): 17 - 27, 2006.
- FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A. **Dormência em sementes florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2000. 27p. (Embrapa Florestas. Documentos, 40).
- GOLLE, D. P. **Germinação *in vitro* de *Pinus taeda* L. a partir de sementes selecionadas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria, 2007.



HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol- changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. **Plant Disease**, v.84, p.377-392, 2000.

HARMAN, G. E. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. **New Phytologist**, v. 189, p. 647-649, 2011.

HOFS, A.; SCHUCH, L. O. B.; PESKE, S. T.; BARROS, A. C. S. A.; Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes** vol.26 n°.1 Pelotas 2004.

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. & BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotrop.** 2009 (3).

LUDWIG, M. P.; SCHUCH, L. O. B.; FILHO, O. A. L.; AVELAR, S. A. G. A.; MIELEZRSKI; PANOZZO, L. E.; SEUS, M. O. R. Desempenho de plantas de feijão originadas de lotes de sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, v.15, n.2, p.44-52, 2008.

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.

MACIEL, C. G. *Fusarium sambucinum* associado a sementes de *Pinus elliottii*: **patogenicidade, morfologia, filogenia molecular e controle**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2012.

MACHADO, D. F. M. **Estudo da germinação e do efeito de *Trichoderma* spp. na promoção do crescimento de *Gochnatia polymorpha* (LESS.) Cabrera**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2012.

MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. In: LUZ, W.C. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, RAPP, 1993. p.369-409

MASTOURI, F.; BJORKMAN, T.; HARMAN, G. E. 2010. Seed treatments with *Trichoderma harzianum* alleviate biotic, abiotic and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. **Phytopathology** 100: 1213–1221.

MELO, I. S. de. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Controle biológico**. v.1. Jaguariúna: Embrapa, 1998. p. 17-60.

MICHEREFF, S. J.; MENEZES, M. & MARIANO, R. L. R. Antagonismo de espécies de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum graminicola*, agente da antracnose do sorgo em condições de laboratório. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.19, p.14-17, 1993.

MONTALVÃO, S. C. **Potencial de *Trichoderma* spp. no biocontrole de doenças de tomateiro**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília, Brasília-DF, 2012.

OLIVEIRA, G. G. de. ***Trichoderma* spp. no crescimento vegetal e no biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum* e de patógenos em sementes de cártamo (*Carthamus tinctorius*)**. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, 2007.

PANDOLFO, J. D. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli***. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2007.

PEDRO, E. A. S.; ANTUNES, K. R.; LUCON, C. M. M.; FERRARI, J. R.; NOGUEIRA, E. M. C. Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial para o controle de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. **Biológico**, São Paulo, v. 70, n.2, p.107-216, 2008.

SHIMIZU, J. Y. **Cultivo do Pinus**. Embrapa Florestas, Sistemas de Produção, Nov. 2005.

SHORESH, M.; MASTOURI, F.; HARMAN, G. E. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. **Annual review of Phytopathology** 48: 21–43.

SILVA, F. de A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat- Statistical Attendance. In: **WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE**, 7, Reno-NV-USA: **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, 2009.

SILVA, J. C. **Seleção de isolados de *Trichoderma* spp. no controle biológico da queimada-bainha (*Rhizoctonia solani* Kühn) em arroz (*Oryza sativa* L.)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.