UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

FUNGOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Pinus taeda* L.

DISSERTAÇÃO

FERNANDA BORTOLANZA PEREIRA

IRATI –PR

2017

FERNANDA BORTOLANZA PEREIRA

FUNGOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO E PRODUÇÃO DE MUDAS DE *Pinus taeda* L.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração Manejo Sustentável de Recursos Florestais, área de atuação Proteção Florestal, para obtenção do título de Mestre em Ciências Florestais.

Prof. Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia

Orientador

Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi

Co-orientador

IRATI-PR

2017

Catalogação na Fonte
Biblioteca da UNICENTRO

P436f

PEREIRA, Fernanda Bortolanza.

Fungos promotores de crescimento e de mudas de *Pinus taeda* L. / Fernanda Bortolanza Pereira. – Irati, PR : [s.n], 2017.

50 f.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia

Coorientador: Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais. Área de concentração Manejo Sustentável de Recursos Florestais. Área de atuação Proteção Florestal. Universidade Estadual do Centro-Oeste, PR.

1. Engenharia Florestal – dissertação. 2. Trichoderma. 3. Mudas Florestais. 4. Seleção massal. 5. Controle biológico. 6. Biocontrole. 7. Fusarium proliferatum. I. Garcia, Flávio Augusto de Oliveira. II. Tambarussi, Evandro Vagner. III. UNICENTRO. IV. Título.

CDD 585.2

TERMO DE APROVAÇÃO

Defesa Nº 102

Fernanda Bortolanza Pereira

"Fungos promotores de crescimento e produção de mudas de *Pinus taeda* L."

Dissertação aprovada em 22/02/2017, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, área de concentração em Manejo Sustentável de Recursos Florestais, da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela seguinte Banca Examinadora:

Dra. Graziela Piveta
Universidade Federal de Santa Maria
Primeira Examinadora

Dra. Fabiana Schmidt Bandeira Peres
Universidade Estadual do Centro-Oeste
Segunda Examinadora

Dr. Evandro Vagner Tambarussi
Universidade Estadual do Centro-Oeste
Terceiro Examinador

Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia
Universidade Estadual do Centro-Oeste
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Irati - PR
2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que são minha fortaleza e inspiração, Nelson Pereira e Letícia Bortolanza Pereira, e ao meu avô, Hilário Bortolanza, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e da inteligência.

Aos meus pais, Nelson Pereira e Letícia Bortolanza Pereira, por sempre me apoiarem e darem suporte em todas as esferas, me incentivarem a continuar nessa caminhada acadêmica. Obrigada pai e mãe pelos sacrifícios feitos até hoje para que eu pudesse chegar aonde cheguei. Não fossem vocês, nada seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Flávio Augusto de Oliveira Garcia, pela orientação ao longo deste trabalho, pelos conselhos, paciência e amizade e por sempre acreditar no meu potencial como futura pesquisadora.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Evandro Vagner Tambarussi, pela amizade, por acreditar no meu trabalho e capacidade, me incentivar e dar oportunidade de desenvolver e expandir meus horizontes acadêmicos.

Aos mestres que passaram por minha formação, desde a base até a pós-graduação, em especial às professoras Dra. Kátia Cylene Lombardi e Dra. Fabiana Schmidt Bandeira Peres, pelas horas de conversa, incentivo, auxílio e amizade.

Aos colegas de laboratório, especialmente Fernanda Rocha, Giovanna Marcolin, Dra. Graziela Piveta, Alexandre Garret, Adriely F. Teixeira e Ana Claudia Spassin, pelos momentos de descontração, amizade, apoio e “choro”.

A todos meus amigos que de alguma forma sempre estiveram presentes, física ou emocionalmente. Meu muito obrigada à família Buhrer por me acolher desde a primeira vez que fui à sua casa e desde então terem me “adotado” em seu meio. Obrigada Renata Buhrer por ter estado ao meu lado nos piores momentos e por ter me dado todo incentivo sempre, acreditando em mim quando eu não tinha a mesma fé. Obrigada Fernanda Rocha por aguentar minhas reclamações, fazer o melhor mate, me apresentar as melhores músicas e, principalmente, por ser um exemplo de mulher e mãe.

Aos meus familiares, especialmente à minha madrinha Hegla e família, por sempre terem apoiado e acreditado nesse trabalho.

À Universidade Estadual do Centro-Oeste pela disponibilidade da infraestrutura e aos seus funcionários, especialmente Gigliese Mendes, Adriane Mores, Odiméia Teixeira e Ariel Gavlak, por todo suporte prestado.

À Capes, pela concessão da bolsa e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Apesar dos avanços técnicos e científicos experimentados pelo setor florestal ao longo das últimas décadas, quando se trata da produção de mudas, problemas enfrentados há 20 anos ainda persistem na atualidade, apesar de serem o insumo preponderante ao sucesso dos empreendimentos florestais. Neste escopo, explorar a riqueza de microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas demonstra ser uma alternativa viável para obtenção de mudas de qualidade morfológica e fisiológica superior, aumentando as possibilidades de sobrevivência das mesmas às adversidades de campo. Uma grande diversidade de microrganismos associados às plantas pode ser utilizada com o objetivo de se promover o crescimento de mudas ou ainda atuar na proteção das mesmas contra microrganismos patogênicos. Dessa forma, o presente trabalho dividiu-se em três partes, buscando obter ao menos um isolado fúngico com propriedades de promoção de crescimento em mudas de *Pinus taeda* L.: i) Isolar fungos a partir de material de campo e avaliar o efeito da inoculação destes sobre o crescimento das mudas, a fim de selecionar ao menos dois isolados com potencial de promoção de crescimento; ii) Confirmar o efeito promotor de crescimento dos isolados selecionados, determinando a melhor fase da produção de mudas seminais para inoculação; iii) Verificar se os isolados selecionados apresentam capacidade de controle biológico de *Fusarium proliferatum* Schltdl. associado às sementes de *P. taeda*. Da seleção massal, dois isolados foram selecionados, I14R e I51, ambos pertencentes ao gênero *Trichoderma* Pers., reconhecido amplamente na literatura pelos efeitos de promoção de crescimento e controle biológico. Entretanto, no ensaio de confirmação, apenas o isolado I51 demonstrou efeito sobre as variáveis de crescimento avaliadas, dada a interação com condições ambientais do ensaio. No experimento de controle biológico de *F. proliferatum*, ambos os isolados foram eficientes no teste de confrontação direta *in vitro*. Contudo, no ensaio *in vivo*, nenhum dos isolados mostrou-se eficiente possivelmente devido à forma de inoculação dos mesmos.

Palavras-chave: *Trichoderma*, pinus, mudas florestais, seleção massal, controle biológico, biocontrole, *Fusarium proliferatum*.

ABSTRACT

Despite the technological advances experienced by the forest sector over the last decades to seedling production, the problems faced twenty years ago, persist today even being the main input for the success of forestry enterprises. In this scope, exploring the richness of microorganisms capable to promoting the growth of plants can be a viable alternative to obtain seedlings with superior morphological and physiological quality, increasing the chances of their survival to the field adversities. A large diversity of microorganisms associated to plants can be used to promote the growth of seedlings or to act to protect them against pathogenic microorganisms. Based on this, the present work was divided into three parts, seeking to obtain at least one fungal isolate with growth promoting properties in *Pinus taeda* L. seedlings: i) Fungi isolation from field material and evaluation the effect of inoculation on seedling growth, to select at least two isolates with potential for growth promotion; ii) Confirmation of the growth promoting effect of the selected isolates, determining the best time for inoculation; iii) Verification if the selected isolates present, in addition to the growth promoting effect, biological control capacity of *Fusarium proliferatum* Schltdl. associated with *P. taeda* seeds. From the mass selection, two isolates were selected, I14R and I51, both belonging to the genus *Trichoderma* Pers., widely recognized in the literature for the effects of growth promotion and biological control. In the biological control experiment of *F. proliferatum*, both isolates were efficient in the direct *in vitro* comparison test. However, in the *in vivo* assay, none of the isolates proved to be efficient due to the way of inoculation thereof.

Palavras-chave: *Trichoderma*, pinus, forest seedlings, mass selection, biological control, biocontrol, *Fusarium proliferatum*.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS ..... **i**
LISTA DE QUADROS ..... **i**

INTRODUÇÃO GERAL **2**
HIPÓTESES DE TRABALHO **5**
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **5**

CAPÍTULO 1: SELEÇÃO MASSAL DE ISOLADOS FÚNGICOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE *Pinus taeda* **8**
1. INTRODUÇÃO **8**
2. OBJETIVOS **9**
2.1 OBJETIVO GERAL 9
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 9
3. MATERIAL E MÉTODOS **10**
3.1. ISOLAMENTO 10
3.1.1. Isolamento a partir dos sistemas radiculares das mudas 10
3.1.2. Isolamento a partir da serapilheira coletada sob plantios comerciais 11
3.2. ENSAIO DE SELEÇÃO MASSAL DOS ISOLADOS FÚNGICOS 12
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA 13
3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS SELECIONADOS 13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **13**
4.1 ISOLADOS 13
4.2. RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS 14
4.3. INCREMENTO OBSERVADO 19
4.4. SELEÇÃO DE ISOLADOS 21
5. CONCLUSÕES **23**
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **23**

CAPÍTULO 2: INOCULAÇÃO DE *Trichoderma* SPP. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM *Pinus taeda* **26**
1. INTRODUÇÃO **26**
2. OBJETIVOS **27**
2.1. OBJETIVO GERAL 27
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27
3. MATERIAL E MÉTODOS **27**
3.1. PRODUÇÃO DOS ISOLADOS 27
3.2. PRODUÇÃO DE MUDAS SEMINAIS DE *P. taeda* MEDIADA POR *Trichoderma* spp. 28
3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA 29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **29**
5. CONCLUSÕES **33**
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **33**

CAPÍTULO 3: CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium proliferatum* POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. EM *Pinus taeda* 36
1. INTRODUÇÃO 36
2. OBJETIVOS 37
2.1. OBJETIVO GERAL 37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 37
3. MATERIAL E MÉTODOS 38
3.1. ISOLADOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO 38
3.2. ISOLADO PATOGÊNICO 38
3.3. ENSAIO DE CONFRONTAÇÃO DIRETA *IN VITRO* 38
3.3.1. Montagem do ensaio de confrontação direta *in vitro* 38
3.3.2. Avaliação do ensaio de confrontação direta *in vitro* 39
3.3.3. Delineamento do ensaio 39
3.4. ENSAIO DE CONTROLE BIOLÓGICO *IN VIVO* *40*
3.4.1. Montagem do ensaio de controle biológico *in vivo* 40
3.4.2. Delineamento do ensaio 40
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 41
4.1. ENSAIO DE CONFRONTAÇÃO DIRETA *IN VITRO* 41
4.2. ENSAIO DE CONTROLE BIOLÓGICO *IN VIVO* 43
5. CONCLUSÕES 47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio de cultura Merlin-Norkrans Modificado (Modified Merlin-Norkrans – MMN). 10
Tabela 2 – Resultados da ANOVA para os fatores estudados e interação. 14
Tabela 3 – Resultado do teste de médias de Scott-Knot para o fator Modo de aplicação (F1) para as variáveis massa seca total (MST), Índice de Qualidade de Dickson (IQD) e massa seca de raiz (MSR). 15
Tabela 4 – Resultado do teste de médias de Scott-Knot para o fator Isolado (F2) para massa seca total (MST). 16
Tabela 5 – Resultado do teste de médias de Scott-Knot para o fator Isolado (F2) para altura de parte aérea. 17
Tabela 6 – Resultado do teste de médias de Skott-Knot para a interação entre os fatores Modo de aplicação (F1) e Isolado (F2), para massa seca radicular (MSR), em gramas. . 18
Tabela 7 – Incremento observado para as variáveis massa seca total (MST), massa seca de raiz (MSR) e altura após a inoculação dos isolados fúngicos obtidos de material de viveiro e campo. 19
Tabela 8 – Resultados da ANOVA para os fatores estudados (modo de aplicação e isolados) e interação entre estes para o ensaio de inoculação dos isolados de *Trichoderma* spp. 30
Tabela 9 – Resultado do teste de médias de Tukey para o fator Isolado (F1) para as variáveis diâmetro de colo (D), altura de parte aérea (H), massa seca de parte aérea (MSA), massa seca total (MST) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD), em *P. taeda*... 30
Tabela 10 – Resultado do teste de médias de Tukey para a interação entre o fator Isolado (F1) e o modo de aplicação (F2) para a variável massa seca radicular (MSR), em gramas. 31
Tabela 11 – Resultados da ANOVA para a nota do ensaio de confrontação direta *in vitro* e crescimento micelial dos antagonistas e patógeno 42
Tabela 12 – Resultado do teste de médias de Tukey para a nota do ensaio de confrontação direta *in vitro* e crescimento micelial dos antagonistas e patógeno. 42
Tabela 13 – Resultados da ANOVA para as variáveis avaliadas no ensaio de controle biológico *in vivo* em plântulas de *Pinus taeda* L. 44
Tabela 14 – Resultado do teste de médias de Tukey para as variáveis avaliadas no ensaio de controle biológico *in vivo* em plântulas de *Pinus taeda* L. 45

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Tratamentos referentes ao ensaio de inoculação fúngica para produção de mudas seminais de *P. taeda*. 28
Quadro 2 – Tratamentos referentes ao ensaio de controle biológico *in vivo*. 41

INTRODUÇÃO GERAL

A base do setor de florestas plantadas brasileiro compreende principalmente espécies exóticas dos gêneros *Pinus* L. e *Eucalyptus* L'Hér. A área plantada totalizou 7,8 milhões de hectares no ano de 2015, dos quais 1,6 milhão de hectares corresponderam à área cultivada com espécies do gênero *Pinus*; na maior parte concentrada nos Estados do Paraná (42%) e Santa Catarina (34%) (IBÁ, 2016).

A espécie *Pinus taeda* L. foi introduzida no país por ação do Instituto Florestal de São Paulo, no ano de 1936, por meio da aquisição de sementes procedentes dos Estados Unidos (AGUIAR et al., 2011; BRACELPA, 2015). A introdução desta espécie no Brasil foi impulsionada pela necessidade de suprir a demanda industrial de madeira serrada, laminada ou para produção de celulose e papel (KRONKA et al., 2005). Entre os anos de 1955 e 1964, em função da Lei de Incentivos Fiscais, grandes programas de reflorestamentos baseados em *P. taeda* e *Pinus elliottii* Engelm. tiveram início e desde então estas espécies se destacam pela facilidade nos tratos culturais e crescimento rápido, predominando na Região Sul do país (BRACELPA, 2015) em função das condições edafoclimáticas locais somada ao fato de os principais centros processadores de madeira deste tipo estarem localizados nesta região (ABRAF, 2013).

Para garantir o sucesso de um programa de plantios florestais é preponderante que as mudas que darão origem à floresta tenham condições morfológicas e fisiológicas adequadas e possam sobreviver e se desenvolver apesar das adversidades do meio. O plantio de mudas apresenta vantagens como assegurar a sobrevivência das plantas a campo e economia de sementes, que é recurso limitante na reprodução de árvores (SIMÕES, 1987). Assim, mudas de elevado padrão de qualidade são insumo essencial para que os objetivos dos plantios florestais sejam alcançados (PEZZUTTI e CALDATO, 2011). O padrão de qualidade de mudas varia com a espécie em questão e entre sítios, sendo o objetivo da produção de mudas atingir um padrão de qualidade tal que estas se apresentem resistentes às adversidades do meio (CARNEIRO, 1995).

Para se definir o que é uma muda de qualidade empregam-se comumente parâmetros morfológicos e fisiológicos que a caracterizem (CARNEIRO, 1995; CARNEIRO et al., 2007; PEZZUTTI e CALDATO, 2011), observados no final do período de produção (CARNEIRO et al., 2007). Dentre estes parâmetros, os morfológicos são preferidos dada a maior facilidade de obtenção, como o diâmetro de colo, altura da parte aérea (CARNEIRO et al., 2007; PEZZUTTI

e CALDATO, 2011), relação entre diâmetro de colo e altura de parte aérea e massa seca (CARNEIRO et al., 2007). Outros parâmetros comumente empregados são a sanidade de mudas, o desenvolvimento do sistema radicular, a lignificação do caule e o material genético (PEZZUTTI e CALDATO, 2011).

Contudo, apesar dos avanços técnicos e científicos alcançados em diversas áreas da Ciência Florestal, a produção de mudas florestais ainda enfrenta os mesmos problemas de décadas atrás, como a ausência de determinação do padrão de qualidade para as espécies cultivadas, tipos inadequados de recipientes, técnicas de cultivo inadequadas e transporte inadequado (CONSTANTINO et al., 2010). Estas carências no processo de produção de mudas e implantação de povoamentos florestais geram uma necessidade de se desenvolverem pesquisas que busquem alternativas que permitam obter mudas de qualidade capazes de superar condições restritivas ao seu desenvolvimento. Neste escopo incluem-se as técnicas biotecnológicas, em que a inoculação de microrganismos é capaz de beneficiar a planta durante seu estabelecimento inicial.

Os microrganismos presentes no meio são essenciais para a sanidade das florestas (KROPP e ALBEE, 1996). Diversos microrganismos podem ser explorados como promotores de crescimento de plantas, como bactérias residentes de filoplano ou de rizosfera, fungos endofíticos e micorrizas (ATLAS e BARTHA, 1998). Esta diversidade microbiana atrelada ao desenvolvimento de plantas é comum na natureza e pode ser explorada pelo homem quanto técnica de promoção de crescimento das plantas de interesse.

As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) , também conhecidas como *PGPR*, são bactérias quaisquer que vivam na rizosfera e que tenham efeito benéfico sobre o crescimento de uma ou mais plantas (FREITAS, 2007). Os usos das RPCPs vão além do maior crescimento por parte das plantas, podendo ser classificadas em função da sua atividade como fertilizadoras, fitoestimuladoras, rizorremediadoras e biopesticidas. Vários gêneros de bactérias compõem o rol de RPCPs, dentre os quais podem ser citados *Agrobacterium* Conn, *Arthronacter* Conn and Dimmick, *Azobacter* Beijerinck, *Bacillus* Cohn, *Caulobacter* Henrici and Johnson, *Chromobacterium* Bergonzini, *Erwinia* Winslow et al., *Micrococcus* Cohn, *Pseudomonas* Migula (AHEMAD e KIBRET, 2014). Vários trabalhos relatam o efeito positivo sobre o crescimento de plantas quando da aplicação de RPCPs, como aumento da matéria seca de raiz e de parte aérea das mudas (MAFIA et al., 2007; CUNHA et al., 2013), germinação das sementes (CUNHA et al., 2013), aumento do enraizamento, aumento do crescimento das mudas (FREITAS e VILDOSO, 2004; MAFIA et al., 2007).

Outras bactérias capazes de promover o crescimento vegetal são as bactérias diazotróficas. Especialmente exploradas em culturas agrícolas, estas bactérias endofíticas fixam biologicamente o nitrogênio atmosférico, o disponibilizando ao seu hospedeiro, leguminosas em geral (OLIVEIRA, 2009). Bactérias residentes de filoplano também estão sendo estudadas como promotoras de crescimento vegetal por diferentes mecanismos, atuando como biocontroladoras de agentes fitopatogênicos (HALFELD-VIEIRA et al., 2014).

Quanto aos fungos com potencial de promoção do crescimento de plantas, podemos citar as espécies do gênero *Trichoderma* Pers. Estes fungos atuam tanto na promoção de crescimento, quanto como agentes de biocontrole de doenças em plantas (REIS et al., 2013). *Trichoderma* spp. já foram relatadas como antagonistas a *Botrytis cinerea* Pers. (FORTES et al., 2007) e *Fusarium sambucinum* Fuckel (MACIEL et al., 2014). Também há estudos que comprovam o efeito como promotores de enraizamento em estacas de *Eucalyptus* sp. (FORTES et al., 2007), produtores de ácido indol-acético (AIA) e solubilizadores de fosfato (OLIVEIRA et al., 2012).

Outros microrganismos estudados há muito tempo com potencial de promoção de crescimento em plantas são os fungos micorrízicos. Dentre os vários microrganismos presentes na rizosfera, as micorrizas apresentam uma característica ecológica única por estarem internamente e externamente associadas às raízes de forma simultânea, de forma que não competem com outros micro-organismos do solo no interior das raízes (ATLAS e BARTHA, 1998). Seus benefícios são vários, como o incremento na habilidade dos hospedeiros em absorver e redistribuir nutrientes e água do solo (KROPP e ALBEE, 1996; ATLAS e BARTHA, 1998; DANIELSEN e POLLE, 2014), transportar e redistribuir carbono entre os hospedeiros por meio da formação de redes de micorrizas (*mycorrhizal network*) (KROPP e ALBEE, 1996; BRUNDRETT, 2004; SIMARD et al., 2012), aumentar a resistência das plantas à doenças e a elementos tóxicos (MARX, 1970; MARX, 1973; ATLAS e BARTHA, 1998; BRUNDRETT, 2004) e elevar a capacidade fotossintetizante do hospedeiro (BRUNDRETT, 2004). A importância do uso de isolados superiores na produção de mudas de espécies florestais é reconhecida, tendo influência na qualidade das plantas e consequente desempenho a campo (CARNEIRO, 1995).

Dadas às possibilidades que o uso de fungos promotores de crescimento na produção de mudas de *Pinus* spp. apresentam, este documento visa relatar os resultados de pesquisa exploratória na produção de mudas seminais de *P. taeda*, com o objetivo de se obter isolados fúngicos de alta performance em viveiro levando à produção de mudas de qualidade superior.

HIPÓTESES DE TRABALHO

As hipóteses de trabalho para a realização desta pesquisa foram:

i) Há fungos micorrízicos nas áreas de produção capazes de promover crescimento e elevar a qualidade das mudas de *P. taeda;*

ii) Há fungos associados às áreas de produção capazes de promover crescimento e elevar a qualidade das mudas de *P. taeda;*

iii) Fungos promotores de crescimento obtidos das áreas produtivas tem efeito de controle biológico sobre patógenos associados às sementes de *P. taeda.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF. **Anuário Estatístico ABRAF 2013 ano base 2012.** ABRAF: Brasília, 2013. 148 p.

AGUIAR, A.V.; SOUSA, V.A.; FRITZSONS, E.; PINTO JÚNIOR, J.E. **Programa de Melhoramento de Pinus da Embrapa Florestas.** Colombo: Embrapa Florestas, 2011, 81 p.

AHEMAD, M.; KRIBET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University,** v. 26, p. 1-20, 2014.

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology:** fundamentals and applications. 4ª Ed. Menlo Park, Califórnia: Benjamin Cummings Science Publishing, 1998. 694 p.

BRACELPA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL. **Pinus.** Disponível em <http://bracelpa.org.br/bra2/?q=node/137> Acesso em 27 set 2015.

BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews,** v. 79, p. 473-495, 2004.

CARNEIRO, J.G.A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais.** Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995, 451 p.

CARNEIRO, J.G.A.; BARROSO, D.G.; SOARES, L.M.S. Crescimento de mudas em raiz nua de *Pinus taeda* L., sob cinco espaçamentos no viveiro e seu desempenho no campo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 305-310, 2007.

CONSTANTINO, V., HIGA, A.R.; SILVA, L.D.; ROSA, J.M.C.; VIANA, J.J. Efeitos de métodos de produção de mudas e equipes de plantadores no crescimento de *Pinus taeda* Linnaeus. **Scientia Florestalis**, v. 38, n. 87, p. 355-366, 2010.

CUNHA, J.F.; ALFENAS, A.C.; SILVA, A.G.; BRANDÃO, I.J. Potencial de rizobactérias no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). **Revista Árvore,** v. 37, n. 2, p. 211-218, 2013.

DANIELSEN, L; POLLE, A. Poplar nutrition under drought as affected by ectomycorrhizal colonization. **Environmental and Experimental Botany,** v. 108, p. 89-98, 2014.

FORTES, F.O.; SILVA, A.C.F.; ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore,** v. 31, n. 22, p. 221-228, 2007.

FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Editoras). **Microbiota do solo e qualidade ambiental.** Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

FREITAS, S.S.; VILDOSO, C.I.A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 987-994, 2004.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; ISHIDA, A.K.N.; SCHURT, D.A. Bactérias de filoplano de maracujazeiro como agentes de controle biológico da mancha-bacteriana. In: **Fórum De Apresentação De Resultados De Pesquisas: Avanços E Oportunidades**, 2014, Jaguariúna. [Anais]. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2014. Disponível em < http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1002458/1/RE011.pdf> Acesso em 10 out 2015.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES – IBÁ. **Relatório Ibá 2016.** Disponível em < http://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2016_.pdf> Acesso em 27 set 2016.

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

KROPP, B.R.; ALBEE, S. The effects of Silvicultural treatments on occurrence of mycorrhizal sporocarps in a *Pinus contorta* forest: a preliminary study. **Biological Conservation,** v. 78, p. 313-318, 1996.

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

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; FERREIRA, E.M.; TEIXEIRA, D.A.; ZAUZA, E.A.V. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore,** v. 31, n. 4, p. 589-597, 2007.

MARX, D.H. Growth of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal shortleaf pine seedlings in soil with *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, v. 63, p. 18-23, 1973.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of Pine roots to pathogenic infections. V. Resistance of mycorrhizae to infection by vegetative mycelium of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 60, p. 1472-1473, 1970.

OLIVEIRA, S.M. **Processos promotores de crescimento vegetal por bactérias diazotróficas de vida livre ou simbióticas de feijão comum, caupi e siratro.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Lavras. Lavras,: UFLA, 2009. 66 p.

OLIVEIRA, A.G.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; SANTOS, G.R.; MILLER, L.O.; CHAGAS, L.F.B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde,** v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

PEZZUTTI, R.V.; CALDATO, S.L. Sobrevivência e crescimento inicial de mudas de *Pinus taeda* L. com diferentes diâmetros de colo. **Ciência Florestal,** v. 21, n. 2, p. 355-362, 2011.

REIS, M.R. LEÃO, E.U.; SANTOS, G.R.; SARMENTO-BRUM, R.B.C; GONÇALVES, C.G.; CARDON, C.H.; SILVA, D.B. Impacto de herbicidas em isolados de *Trichoderma* spp. **Planta Daninha,** v. 31, n. 2, p. 419-426, 2013.

SIMARD, S.W.; BEILER, K.J.; BINGHAM, M.A.; DESLIPPE, J.R.; PHILIP, L.J.; TESTE, F.P. Mycorrhizal networks: mechanisms, ecology and modelling. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, p. 39-60, 2012.

SIMÕES, J.W. Problemática da produção de mudas em essências florestais. **Série Técnica – IPEF,** v. 4, n. 13, p. 1-29, 1987.

CAPÍTULO 1: SELEÇÃO MASSAL DE ISOLADOS FÚNGICOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE *Pinus taeda*

1. INTRODUÇÃO

Utilizar mudas de qualidade é fator preponderante para o sucesso dos programas de plantios florestais por melhorar os índices de sobrevivência das plantas a campo e reduzir custos com operações de replantio (PEZZUTTI e CALDATO, 2011). O padrão de qualidade varia com a espécie e com o sítio, mas a otimização desta implica em maior resistência à adversidades pelas mudas (CARNEIRO, 1995).

Para se definir o que é uma muda de qualidade emprega-se comumente parâmetros morfológicos e fisiológicos que a caracterizem (CARNEIRO, 1995; CARNEIRO et al., 2007; PEZZUTTI e CALDATO, 2011), observados no final do período de produção (CARNEIRO et al., 2007). Dentre estes parâmetros, os morfológicos são preferidos dada a maior facilidade de obtenção, como o diâmetro de colo ou coleto, altura da parte aérea (CARNEIRO et al., 2007; PEZZUTTI e CALDATO, 2011), relação entre diâmetro de colo ou coleto e altura de parte aérea e massa seca (CARNEIRO et al., 2007). Outros parâmetros comumente empregados são a sanidade de mudas, o desenvolvimento do sistema radicular, a lignificação do caule e o material genético (PEZZUTTI e CALDATO, 2011).

Na produção de mudas seminais ou clonais de espécies florestais, problemas relativos ao uso de recipiente inadequado e falta de padrão de qualidade para mudas, por exemplo, persistem nos dias atuais mesmo já sendo relatados desde a década de 1990 (CONSTANTINO et al., 2010). Esses problemas levam à necessidade de buscar, constantemente, novas técnicas e tecnologias que elevem a eficiência do processo produtivo de mudas florestais e melhorem a qualidade das mesmas, muito embora o desenvolvimento de técnicas silviculturais para estimular a germinação de sementes e o crescimento vegetal seja incipiente para a maioria das espécies florestais (CALDAS, 2006).

Microrganismos benéficos associados ao desenvolvimento de plantas são comuns na natureza e apresentam grande diversidade, incluindo rizobactérias, bactérias residentes de filoplano, fungos micorrízicos e outros (LUCON, 2009). Esta diversidade microbiana pode ser explorada pelo homem quanto técnica de promoção de crescimento das plantas de interesse, uma vez que podem apresentar capacidade de melhorar a germinação de sementes, o

crescimento e a produção de plantas, sendo uma alternativa sustentável pesquisada e aplicada tanto em culturas agrícolas quanto florestais (LUCON, 2009; MACHADO et al., 2015).

O hábitat mais rico em fungos é o solo no qual estes organismos tem papel na degradação da matéria orgânica, gerando biomassa proteica ou servindo como alimento para outros organismos (AUER et al., 2006; KURAKOV et al., 2008). A diversidade de fungos encontrados no solo é grande e alguns gêneros são mais comuns do que outros, como *Mucor* Fresen., *Penicillium* Link, *Trichoderma* e *Aspergillus* P. Micheli ex Haller (AUER et al., 2006), podendo ser explorados pelos potenciais antagônicos e de promoção de crescimento.

Em plantios de *P. taeda*, Auer et al. (2006) avaliaram a diversidade dos fungos presentes durante a decomposição de acículas sob povoamentos com seis, 10, 14, 17 e 29 anos de idade, em Três Barras, SC, Brasil e observaram a presença dos seguintes gêneros: *Aureobasidium* Viala & G. Boyer, *Candida* Berkhout, *Cladosporium* Link, *Exophiala* J.W. Carmich., *Fusarium* Link, *Penicillium*, *Pestalotia* De Not., *Rhizoctonia* DC., *Rhizopus* Ehrenb., *Trichoderma* e *Tubercularia* Tode. Os gêneros *Pestalotia*, *Trichoderma* e *Penicillium* foram os mais frequentes e a diversidade fúngica aumentou com o aumento da idade dos talhões.

Com base no exposto, o presente capítulo visa apresentar os resultados obtidos com o isolamento e seleção massal de isolados fúngicos obtidos de material de campo em mudas de *P. taeda*, objetivando a seleção de fungos promotores de crescimento.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inoculação de fungos isolados a partir de material coletado em áreas produtivas (viveiro e campo) sobre variáveis morfológicas em mudas seminais de *P. taeda*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Isolar fungos a partir de material coletado em viveiro e em área de plantio florestal na produção seminal de *P. taeda;*

ii) Selecionar ao menos um isolado com potencial de uso no processo de produção de mudas seminais de *P. taeda*;

iii) Avaliar a melhor forma de aplicação dos isolados fúngicos selecionados em mudas seminais de *P. taeda.*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ISOLAMENTO

O material a partir do qual isolaram-se os fungos foi obtido em viveiro e áreas de plantios comerciais de *P. taeda* da região dos Campos Gerais do Estado do Paraná. Em viveiro coletou-se mudas de pinus com presença de micélio no substrato. Do campo foram coletadas amostras da camada superficial da serapilheira sob plantios comerciais em diferentes idades (três, oito, 12 e 16 anos) compostas pelas acículas depositadas sobre o piso florestal. O material foi armazenado em câmara fria e então enviado em caixa térmica para o Laboratório de Patologia Florestal da UNICENTRO, *Campus* Irati, para os procedimentos de isolamento.

Para a realização do isolamento dos fungos foi utilizado o meio de cultura Merlin-Norkrans Modificado (*Modified Melin-Norkrans* – MMN) com pH ajustado para 5,8 (BRUNDRETT *et al.*, 1996; HARVEY, 1991), por ser um meio mais seletivo e comumente utilizado no isolamentos de fungos micorrízicos (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição do meio de cultura Merlin-Norkrans Modificado (*Modified Merlin-Norkrans* – MMN).

Ingrediente	Quantidade
	-----g-----
Glicose	10,0
Fosfato de Amônio Dibásico – $(NH_4)_2HPO_4$	0,25
Fosfato de Potássio Monobásico – KH_2PO_4	0,50
Sulfato de Magnésio Heptahidratado – $MgSO_4.7H_2O$	0,0732
Cloreto de Cálcio Dihidratado – $CaCl_2.2H_2O$	0,0662
Cloreto de Sódio – NaCl	0,025
Cloreto de Ferro III Hexahidratado – $FeCl_3.6H_2O$	0,02
Tiamina HCl	1×10^{-4}
Ágar	15*
	-----mL-----
Água deionizada	1.000

***** Valor original alterado de 10 g para 15 g.
Fonte: Adaptado de Harvey (1991)

3.1.1. Isolamento a partir dos sistemas radiculares das mudas

O isolamento a partir dos sistemas radiculares de mudas de *P. taeda* foi realizado por duas vias: i) isolamento direto – pela coleta de fragmentos de micélio; ii) isolamento indireto – com a coleta de fragmentos de raiz com cerca de 2 mm de comprimento. Em condição de assepsia em câmara de fluxo laminar, com visualização em binocular estereoscópica e com

auxílio de alça de platina, foram coletados fragmentos das raízes e do micélio fúngico. Os fragmentos de micélio fúngico foram transferidos para placas de Petri (ϕ = 9 mm), devidamente termoesterelizadas e identificadas, contendo meio MMN previamente esterilizado em autoclave à temperatura de 120 ºC e pressão de 1 atm.

As placas contendo o material coletado foram transferidas para incubadora do tipo BOD (*biochemical oxygen demand*) a 25 ± 2º C e fotoperíodo de 12 h, por sete dias até a observação do crescimento e desenvolvimento de microrganismos no meio de cultura sem, contudo, haver o contato físico entre colônias diferentes.

Posteriormente, por meio de identificação visual, os microrganismos obtidos nesta primeira fase foram repicados para outras placas de Petri contendo meio MMN esterilizado buscando-se isolar microrganismos distintos que cresceram numa mesma placa. Cada isolado foi repicado para um tubo de ensaio de 15 mm de espessura e 180 mm de comprimento, contendo aproximadamente 10 mL de meio MMN esterilizado inclinado. Após o cultivo e total recobrimento pelo micélio sobre a superfície do meio de cultura preservou-se os isolados em geladeira em temperatura de 4 ºC.

3.1.2. Isolamento a partir da serapilheira coletada sob plantios comerciais

Para o isolamento a partir da camada superficial da serapilheira, foi empregada a técnica chamada *Imprinting* descrita por Romeiro (2007) para isolamento de bactérias epifíticas e, aqui, adaptada. Em câmara de fluxo laminar vertical em condições de assepsia, uma porção de acículas não lavadas foram pressionadas levemente com o auxílio de pinça esterilizada sobre a superfície do meio MMN esterilizado em placas de Petri (15 mL de meio por placa). As placas foram transferidas para estufa incubadora do tipo BOD, a 25 ± 2 ºC e fotoperíodo de 12 h por sete dias até o crescimento microbiano. Os microrganismos foram repicados para tubos de ensaio (15 mm x 180 mm) contendo 10 mL meio MMN inclinado esterilizado, usando-se binocular estereoscópica e auxílio de alça de platina, e estes foram incubados nas mesmas condições descritas anteriormente em estufa incubadora até seu pleno crescimento sobre o meio e posterior armazenamento em geladeira.

3.2. ENSAIO DE SELEÇÃO MASSAL DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Para a avaliação inicial do efeito dos fungos isolados e dos modos de aplicação foi montado um ensaio de seleção massal em viveiro. Os 100 isolados obtidos foram aplicados de duas formas:

i) Modo de aplicação 1 (M1) – imersão prévia à semeadura das sementes por 12 horas em suspensão celular;

ii) Modo de aplicação 2 (M2) – inoculação única de 10 mL de suspensão celular no substrato no tubete.

As suspensões de cada isolado foram preparadas com concentração de 10^6 propágulos celulares por mililitro (10^6 propágulos.mL^{-1}). A semeadura foi realizada em tubetes de 55 cm^3 contendo substrato comercial (casca de pinus + casca de arroz carbonizada). Os tubetes seguiram por 60 dias em casa de vegetação, seguida por 30 dias em casa de sombra e então a pleno sol até a avaliação do experimento.

O ensaio foi realizado num delineamento em blocos casualizados (DBC) em esquema fatorial, com dois fatores (dois modos de aplicação e 100 isolados), quatro blocos e cinco plantas por tratamento por bloco, num total de 4.020 tubetes semeados.

A avaliação do efeito da inoculação dos isolados sobre as mudas foi realizada aos 145 dias após a semeadura. Os seguintes parâmetros foram observados:

a) Altura de mudas (cm), medida com auxílio de régua milimétrica;
b) Diâmetro do coleto (mm), obtido por meio de paquímetro digital;
c) Massa seca de parte aérea (g);
d) Massa seca de raíz (g);
e) Massa seca total (g);
f) Relação altura de parte aérea e diâmetro de coleto (relação h/d);
g) Índice de qualidade de Dickson (IQD).

A partir dos resultados observados, calculou-se o incremento porcentual para os melhores isolados a partir da equação 1:

$$I = \frac{(x_i - x_0)}{x_0} * 100 \qquad \text{(Eq. 01)}$$

Em que x_i é o valor observado no tratamento *i* e x_0 é o valor observado relativo ao tratamento controle.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, procedeu-se a análise exploratória dos dados com o objetivo de averiguar as pressuposições básicas e necessárias para as análises estatísticas, verificando a necessidade de transformação dos dados. Quando necessário, os dados foram transformados utilizando Box Cox. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de médias de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio de planilha eletrônica e o pacote estatístico Assistat Beta 7.6 (SILVA e AZEVEDO, 2009). Para verificar se as variáveis avaliadas no ensaio apresentavam correlação entre si, foi performada a análise de correlação entre as mesmas, ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software R (R CORE TEAM, 2016).

3.4. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS SELECIONADOS

Os isolados fúngicos selecionados nos ensaios de viveiro foram identificados por meio de sequenciamento da região ITS do rDNA 18S e pela histona H1. O procedimento foi realizado no laboratório de Genética Molecular do Instituto Biológico de São Paulo em parceria com o Dr. Ricardo Harakava.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLADOS

A técnica *Imprinting* adaptada de Romeiro (2007), usualmente empregada para isolar microrganismos a partir de laminas foliares, resultou efetiva para o isolamento dos fungos a partir da serapilheira. Foram obtidos um total de 100 isolados fúngicos, sendo 22 provenientes das mudas coletadas no viveiro e os demais 78 isolados do material de serapilheira – 21 isolados provenientes do plantio de *P. taeda* de 16 anos, 17 isolados do plantio de 12 anos, 19 isolados do plantio de 8 anos e 21 isolados provenientes do material coletado no plantio de 3 anos de idade.

4.2. RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para as variáveis diâmetro, relação h/d e massa seca de parte aérea (MSA) não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre os níveis dos fatores e interação. A variável altura apresentou diferença estatisticamente significativa ($p<5\%$) apenas entre os níveis do fator isolado (F2), enquanto para o Índice de Qualidade de Dickson (IQD) as diferenças foram significativas apenas para o fator modo de aplicação (F1) (Tabela 2).

Para massa seca total (MST), ambos os fatores apresentaram valor de *F* significativo na ANOVA, enquanto que a única variável que apresentou interação estatisticamente significativa entre os fatores foi massa seca de raiz (MSR) (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados da ANOVA para os fatores estudados (Modo de aplicação – F1 e Isolados – F2) e interação (F1xF2) para as variáveis diâmetro do coleto, altura, relação h/d, massa seca de parte aérea (MSA), massa seca de raiz (MSR), massa seca total (MST) e índice de qualidade de Dickson (IQD).

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	Diâmetro de coleto (mm)	Altura (cm)	Relação h/d	MSA (g)	MSR (g)	MST (g)	IQD
		QUADRADO MÉDIO						
Modo de aplicação (Fator 1)	1	0,005^{ns}	2,707^{ns}	0,591^{ns}	0,120^{ns}	4,590**	0,930**	0,472**
Isolados (Fator 2)	100	0,095^{ns}	4,751*	0,346^{ns}	0,068^{ns}	0,072**	0,088*	0,019^{ns}
Interação (Fator 1 x Fator 2)	100	0,073^{ns}	3,427^{ns}	0,351^{ns}	0,069^{ns}	0,068*	0,082^{ns}	0,018^{ns}
Tratamentos	201	0,084^{ns}	4,083*	0,350^{ns}	0,069 **	0,092**	0,089**	0,021**
Blocos	3	0,308**	7,679^{ns}	1,096*	0,036^{ns}	0,012^{ns}	0,031^{ns}	0,006^{ns}
Erro	603	0,077	3,491	0,321	0,056	0,049	0,069	0,017
Coeficiente de Variação (%)		11,99	13,33	9,35	15,83	18,10	26,18	22,17
Qui-quadrado (χ^2)		193,42	203,00	243,69	235,27	192,88	202,22	202,37

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha \leq 0,01$); * Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq \alpha \leq 0,05$); ^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao fator modo de aplicação (F1), para as variáveis MST e IQD, a aplicação direta da suspensão de propágulos celulares no substrato resultou em médias maiores (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultado do teste de médias de Scott-Knot para o fator Modo de aplicação (F1) para as variáveis massa seca total (MST) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD).

Modo de aplicação (F2)	**MST (g)**		**IQD**	
Microbiolização	0,99	b	0,13	B
Substrato	1,06	a	0,14	A

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de médias de Scott-Knot, ao nível de probabilidade de 5%.

Apesar de o método de microbiolização ser relativamente mais simples de ser aplicado, demandando menor quantidade de suspensão celular e, consequentemente, menor número de placas para crescimento dos isolados em laboratório, a aplicação direta no substrato mostrou-se mais eficiente. Considerando o efeito promotor de crescimento sobre as mudas, o melhor método dentre os testados é a inoculação direta no substrato, efeito que pode ser atribuído à maior quantidade de inóculo presente no ambiente, em função do volume de suspensão aplicada diretamente no substrato, propiciando condições de sobrevivência no meio até o momento favorável para desenvolvimento dos fungos, dado que a quantidade de inóculo inicial é um fator que influencia o sucesso da colonização fúngica (BALMER et al., 1966; GOMIDE et al., 2009). Para outros objetivos, como o controle biológico de patógenos associados às sementes, a microbiolização pode se apresentar como a alternativa viável (CARVALHO et al., 2011).

Para o fator isolado (F2), as variáveis foram classificadas em dois grupos pelo teste de médias de Scott-Knot. As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados do teste de médias para massa seca total (MST) e altura da parte aérea, respectivamente.

Na avaliação da MST (Tabela 4), 34 isolados foram estatisticamente maiores que o tratamento controle, cuja média resultou 0,73 g, com as médias superiores variando entre 1,04 e 1,24 g.

O teste de Skott-Knott separou um grupo de 47 isolados apresentando maior altura de parte aérea em relação ao tratamento controle (Tabela 5), variando entre 14,2 cm e 16,0 cm, enquanto o tratamento controle apresentou uma média de altura de 11,9 cm. Tendo a altura como um dos parâmetros mais comumente avaliados no controle de qualidade de mudas (CARNEIRO, 1995; CARNEIRO et al., 2007) observa-se um valoroso efeito dos 47 isolados sobre essa variável.

Para a variável MSR (Tabela 6), os isolados que obtiveram as maiores médias não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os métodos de inoculação. Contudo, as maiores médias, foram observadas para o método de inoculação da suspensão

celular diretamente no substrato, o que corrobora com os resultados observados para massa seca total e IQD (Tabela 3). Um grupo de 39 isolados apresentou médias superiores para aplicação no substrato, variando entre 0,81 e 0,49 g, e diferindo do tratamento controle, cuja média foi igual a 0,31 g.

Tabela 4 - Resultado do teste de médias de Scott-Knot para o fator Isolado (F2) para massa seca total (MST).

Isolado	MST (g)	Isolado	MST (g)	Isolado	MST (g)
I14R	1,24 a	I79	1,03 b	I100	0,94 b
I51	1,24 a	I20R	1,03 b	I91	0,94 b
I29	1,23 a	I78	1,02 b	I38	0,93 b
I19R	1,23 a	I50	1,02 b	I18R	0,93 b
I24	1,20 a	I110	1,01 b	I63	0,93 b
I13R	1,17 a	I101	1,01 b	I64	0,92 b
I27	1,16 a	I80	1,01 b	I59	0,92 b
I61	1,16 a	I16	1,01 b	I31	0,92 b
I84	1,16 a	I25	1,00 b	I55	0,92 b
I95	1,15 a	I23	1,00 b	I19	0,92 b
I34	1,15 a	I9R	1,00 b	I47	0,92 b
I40	1,14 a	I23R	1,00 b	I1R	0,91 b
I114	1,14 a	I90	1,00 b	I69	0,91 b
I36	1,14 a	I3R	0,99 b	I45	0,90 b
I71	1,14 a	I17R	0,99 b	I12	0,90 b
I85	1,14 a	I57	0,99 b	I18	0,90 b
I22R	1,14 a	I76	0,99 b	I13	0,90 b
I7R	1,12 a	I103	0,98 b	I111	0,90 b
I6R	1,12 a	I68	0,98 b	I11	0,89 b
I54	1,11 a	I15	0,98 b	I53	0,89 b
I20	1,09 a	I74	0,97 b	I6	0,89 b
I28	1,09 a	I10	0,97 b	I15R	0,88 b
I48	1,08 a	I43	0,97 b	I14	0,87 b
I21	1,08 a	I67	0,97 b	I58	0,87 b
I5	1,08 a	I8R	0,97 b	I22	0,87 b
I86	1,07 a	I4R	0,97 b	I75	0,87 b
I2R	1,07 a	I12R	0,96 b	I30	0,86 b
I42	1,06 a	I33	0,96 b	I16R	0,85 b
I92	1,05 a	I35	0,95 b	I5R	0,85 b
I8	1,05 a	I11R	0,95 b	I109	0,84 b
I99	1,05 a	I72	0,95 b	I104	0,84 b
I89	1,05 a	I10R	0,94 b	I108	0,82 b
I60	1,05 a	I52	0,94 b	Controle	0,73 b
I112	1,04 a	I106	0,94 b		

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de probabilidade de 5%.

Tabela 5 - Resultado do teste de médias de Scott-Knot para o fator Isolado (F2) para altura de parte aérea.

Isolado	Altura (cm)	Isolado	Altura (cm)	Isolado	Altura (cm)
I19R	16,0 a	I85	14,4 a	I59	13,7 b
I3R	15,8 a	I42	14,3 a	I25	13,7 b
I34	15,7 a	I99	14,3 a	I55	13,7 b
I72	15,2 a	I2R	14,3 a	I53	13,7 b
I76	15,2 a	I8R	14,2 a	I79	13,7 b
I114	15,2 a	I95	14,2 a	I50	13,6 b
I43	15,1 a	I101	14,2 a	I21	13,6 b
I86	15,1 a	I30	14,2 a	I18R	13,5 b
I5	15,0 a	I74	14,2 a	I5R	13,5 b
I40	15,0 a	I19	14,2 a	I91	13,5 b
I67	15,0 a	I29	14,2 a	I13R	13,5 b
I20R	14,9 a	I9R	14,2 a	I20	13,5 b
I27	14,9 a	I17R	14,0 b	I100	13,4 b
I6R	14,9 a	I106	14,0 b	I10	13,4 b
I7R	14,9 a	I57	14,0 b	I69	13,3 b
I24	14,8 a	I61	14,0 b	I23R	13,3 b
I28	14,8 a	I52	14,0 b	I13	13,2 b
I71	14,8 a	I35	13,9 b	I64	13,2 b
I11R	14,7 a	I10R	13,9 b	I90	13,2 b
I84	14,7 a	I14R	13,9 b	I1R	13,1 b
I36	14,7 a	I78	13,9 b	I104	13,1 b
I54	14,6 a	I63	13,9 b	I22	13,1 b
I33	14,6 a	I12R	13,9 b	I16R	13,1 b
I68	14,6 a	I23	13,9 b	I15R	13,1 b
I109	14,6 a	I103	13,9 b	I6	13,0 b
I14	14,5 a	I38	13,9 b	I92	12,9 b
I22R	14,5 a	I4R	13,8 b	I11	12,9 b
I16	14,5 a	I12	13,8 b	I112	12,8 b
I89	14,5 a	I48	13,8 b	I58	12,8 b
I51	14,4 a	I60	13,8 b	I108	12,7 b
I80	14,4 a	I45	13,8 b	I111	12,6 b
I31	14,4 a	I18	13,8 b	I75	11,9 b
I110	14,4 a	I47	13,7 b	Controle	11,9 b
I15	14,4 a	I8	13,7 b		

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de probabilidade de 5%.

Tabela 6 – Resultado do teste de médias de Skott-Knot para a interação entre os fatores Modo de aplicação (F1) e Isolado (F2), para massa seca radicular (MSR), em gramas.

Isolado	Modo de aplicação				Isolado	Modo de aplicação				Isolado	Modo de aplicação			
	Microbiolização		Substrato			Microbiolização		Substrato			Microbiolização		Substrato	
I51	0,3645	bA	0,8075	aA	I76	0,3511	aA	0,4925	aA	I18R	0,4286	aA	0,4200	aB
I14R	0,4114	aA	0,7550	aA	I79	0,3511	aA	0,4925	aA	I80	0,3409	aA	0,4200	aB
I54	0,3882	bA	0,6850	aA	I92	0,4204	aA	0,4875	aA	I59	0,3733	aA	0,4175	aB
I85	0,3771	aA	0,6625	aA	I15R	0,3287	bA	0,4850	aA	I13	0,3921	aA	0,4150	aB
I24	0,4561	aA	0,6525	aA	I33	0,3911	aA	0,4850	aA	I18	0,3312	aA	0,4150	aB
I19R	0,4288	aA	0,6325	aA	I6	0,3367	aA	0,4775	aB	I64	0,3525	aA	0,4125	aB
I68	0,3367	bA	0,6233	aA	I40	0,3864	aA	0,4775	aB	I69	0,3406	aA	0,4100	aB
I61	0,4012	bA	0,6225	aA	I72	0,3367	aA	0,4750	aB	I1R	0,3192	aA	0,4082	aB
I29	0,5306	aA	0,6125	aA	I5	0,4073	aA	0,4700	aB	I11R	0,4329	aA	0,4050	aB
I112	0,3486	bA	0,6125	aA	I20	0,4314	Aa	0,4700	aB	I20R	0,4433	aA	0,4050	aB
I36	0,3390	bA	0,5950	aA	I12	0,2667	aA	0,4650	aB	I43	0,3545	aA	0,4025	aB
I27	0,4353	aA	0,5900	aA	I42	0,4226	aA	0,4625	aB	I6R	0,4200	aA	0,4000	aB
I86	0,3985	aA	0,5800	aA	I7R	0,4650	aA	0,4623	aB	I16R	0,3986	aA	0,3975	aB
I95	0,4292	aA	0,5800	aA	I103	0,3194	aA	0,4600	aB	I22	0,2899	aA	0,3975	aB
I84	0,4583	aA	0,5650	aA	I101	0,4330	aA	0,4575	aB	I19	0,3667	aA	0,3933	aB
I28	0,3944	aA	0,5475	aA	I21	0,5021	aA	0,4525	aB	I16	0,4759	aA	0,3900	aB
I22R	0,4740	aA	0,5425	aA	I9R	0,4183	aA	0,4515	aB	I53	0,3284	aA	0,3825	aB
I48	0,3078	bA	0,5425	aA	I78	0,3468	aA	0,4475	aB	I14	0,3020	aA	0,3775	aB
I74	0,3136	bA	0,5400	aA	I38	0,3684	aA	0,4450	aB	I55	0,3727	aA	0,3775	aB
I60	0,3758	aA	0,5350	aA	I114	0,4041	aA	0,4450	aB	I5R	0,3205	aA	0,3758	aB
I13R	0,5690	aA	0,5300	aA	I23	0,4156	Aa	0,4425	aB	I104	0,3880	aA	0,3750	aB
I17R	0,3630	aA	0,5300	aA	I67	0,3214	aA	0,4425	aB	I109	0,3218	aA	0,3700	aB
I47	0,2948	bA	0,5300	aA	I71	0,5034	aA	0,4425	aB	I8R	0,4424	aA	0,3678	aB
I35	0,3111	bA	0,5175	aA	I58	0,3553	aA	0,4375	aB	I10	0,4451	aA	0,3625	aB
I90	0,3497	bA	0,5175	aA	I110	0,4631	aA	0,4375	aB	I4R	0,3355	aA	0,3528	aB
I106	0,3230	bA	0,5175	aA	I100	0,3864	aA	0,4350	aB	I111	0,4472	aA	0,3525	aB
I108	0,2572	bA	0,5150	aA	I23R	0,3947	aA	0,4325	aB	I11	0,3885	aA	0,3475	aB
I8	0,4682	aA	0,5125	aA	I34	0,4543	aA	0,4325	aB	I45	0,3902	aA	0,3425	aB
I15	0,3600	aA	0,5125	aA	I75	0,3127	aA	0,4325	aB	I10R	0,4539	aA	0,3382	aB
I89	0,3908	aA	0,5100	aA	I99	0,4204	aA	0,4300	aB	I63	0,3895	aA	0,3225	aB
I91	0,2842	bA	0,5075	aA	I30	0,2790	Aa	0,4275	aB	I52	0,3987	aA	0,3200	aB
I25	0,3772	aA	0,5025	aA	I57	0,3627	aA	0,4275	aB	Controle	0,3137	aA	0,3137	aB
I12R	0,3773	aA	0,5000	aA	I31	0,3585	aA	0,4225	aB	I2R	0,5179	aA	0,3117	bB
I50	0,3621	aA	0,4950	aA	I3R	0,3828	aA	0,4203	aB					

Letras maiúsculas diferenciam os isolados para um mesmo modo de aplicação enquanto letras minúsculas diferenciam a performance do isolado entre os modos de aplicação, pelo teste de médias de Skott-Knot, ao nível de probabilidade de 5%.

4.3. INCREMENTO OBSERVADO

A Tabela 7 apresenta o incremento percentual máximo e mínimo para os isolados que obtiveram resultados estatisticamente superiores ao observado no tratamento controle, para as variáveis MST, MSR e altura, após a inoculação dos isolados fúngicos.

Tabela 7 – Incremento observado para as variáveis massa seca total (MST), massa seca de raiz (MSR) e altura após a inoculação dos isolados fúngicos obtidos de material de viveiro e campo.

Variável	Tratamento Controle	Isolados com efeito significativo		Incremento (%)	
		Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
MST (g)	0,73	1,04	1,24	42,46	69,86
MSR* (g)	0,31	0,49	0,81	58,06	161,29
Altura (cm)	11,9	14,2	16,0	19,33	34,45

* Considerando o modo de aplicação direta no substrato.

Uma vez que o efeito promotor de crescimento de diversos microrganismos é reconhecido, trabalhos relatando este efeito a partir da inoculação de fungos de diversos gêneros e em diferentes formas de associação mutualística benéfica podem ser encontrados para várias culturas, especialmente agronômicas. Entretanto, estudos com espécies florestais e, em especial, com coníferas do gênero *Pinus*, são raros na literatura. Sabe-se que o uso de isolados superiores, como os de fungos micorrízicos, na produção de mudas de espécies florestais tem influência na qualidade das plantas e consequente desempenho a campo (CARNEIRO, 1995), mas ainda hoje representa um desafio para o bom desenvolvimento e sobrevivência em condições de campo de espécies do gênero *Pinus* (AUER e SANTOS, 2013).

Em relação à altura, o incremento observado variou entre 19,33 e 34,45% para este experimento (Tabela 7). Em viveiros florestais em que se produz milhões de mudas por ano, incrementos como estes podem representar ganhos significativos de grande monta, inclusive financeiros. Castrillón et al. (2015), ao estudarem o efeito da inoculação de ectomicorrizas (ECM) (*Amanita muscaria* (L.) Lam, *Suillus luteus* (L.) Roussel e *Amanita* sp. Pers.) no crescimento e absorção de fósforo em mudas de *Pinus patula* Schltdl. & Cham., *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl. e *Pinus tecunumanii* F. Schwerdtf. ex Eguiluz & J.P.Perry, observaram que, com exceção do *P. patula*, houve incrementos na altura das mudas entre 9,3% e 22,3% para *P. tecunumanii* e entre 7,8% e 37,0% para *P. oocarpa*. Álvarez-Sanchez et al. (2013) observaram que a inoculação de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) em mudas de *Pinus halepensis*

Mill. levou a um incremento da ordem de 30,1% na altura das mudas, valor próximo ao máximo observado para *P. taeda* neste estudo.

Para as variáveis MSR e MST, os incrementos observados nos tratamentos estatisticamente significativos em *P. taeda* variaram entre 58,06 e 161,29% e entre 42,46 e 69,86%, respetivamente. Para *Pinus elliottii* Engelm., Silva et al. (2003) observaram que a inoculação de ECM do gênero *Pisolithus* spp. Alb. & Schwein levaram, aos cinco meses da condução do experimento, a um aumento na massa verde radicular na ordem de 20,2% e 41,8%, enquanto Castrillón et al. (2015), também trabalhando com ECM observaram que, para MSR, os incrementos para *P. patula*, *P. tecunumanii* e *P. oocarpa* variaram entre 24% e 68%, em relação ao tratamento controle.

Álvarez-Sanchez et al. (2013) trabalhando com FMA em mudas de *P. halepensis* obtiveram um incremento da ordem de 38,5% na MSR. Reglínski et al. (2012) estudaram o efeito de quatro isolados de *Trichoderma atroviride* P.Karst. no crescimento de *Pinus radiata* D. Don e observaram que, após seis meses da inoculação, não houve efeito significativo na altura das plantas, porém a biomassa de raiz apresentou aumento entre 40-50% em relação ao tratamento controle.

Narloch (2002) testou a inoculação de ECM e de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF) em *P. taeda*. Para os fungos ECM, o autor observou incremento em torno de 28% para MSR, enquanto dentre os MSF destacou-se o isolado do gênero *Penicillium*, com um incremento igual a 32,69%. Para MST, o autor observou incrementos estatisticamente significantes para inoculação de ECM na faixa de 17,06 a 37,79%, enquanto o *Penicillium* sp. levou a um aumento igual a 46,72%, dado o efeito solubilizador de fosfato do mesmo.

Para massa seca de parte aérea (MAS) em *P. tecunumanii* e *P. oocarpa*, Castrillón et al. (2015) observaram incrementos entre 20% e 64%, enquanto que para *P. halepensis* inoculado com FMA, Álvarez-Sanchez et al. (2013) observaram um incremento igual a 36,5%. Reglínski et al. (2012) também observaram efeito positivo, com incrementos superiores a 25% em relação ao tratamento controle na MSA de mudas de *P. radiata* inoculadas com *T. atroviride*.

Os resultados observados para as mudas de *P. taeda*, superiores aos percentuais observados na literatura, indicam o grande potencial promotor de crescimento dos isolados obtidos a partir de mudas e da serapilheira sob plantios comerciais de *P. taeda.* Uma razão para este efeito mais acentuado pode ser o fato dos isolados terem sido obtidos de áreas associadas

à espécie à qual eles foram inoculados há muito tempo e, portanto, já terem estabelecido, evolutivamente, relações benéficas.

4.4. SELEÇÃO DE ISOLADOS

Para a seleção dos isolados, considerou-se como variáveis de maior peso as massas secas total e de sistema radicular em função da relação destas com o acúmulo de carbono e nutrientes, essencial para o desenvolvimento a campo das mudas, e em função da interação com o microrganismo promotor influenciar a massa seca da planta por elevar a taxa fotossintética e o crescimento (REID et al., 1983; LAMHAMEDI et al., 1992). Conforme Marx et al. (1991), a massa seca é a variável mais sensível à inoculação de fungos, representando melhor o efeito dos tratamentos, enquanto a altura, apesar de ser uma variável importante junto ao diâmetro de colo/coleto na classificação das mudas em termos de qualidade, não é adequada para medir diferenças pequenas entre tratamentos.

Muito embora o diâmetro de colo/coleto também seja uma variável excelente para avaliação do efeito da inoculação, em função da obtenção não-destrutiva somado ao fato de estar, em geral, fortemente correlacionada com a massa seca, especialmente a radicular (MARX et al., 1991), os resultados observados para análise de correlação (Figura 1) não indicaram correlação forte e significativa entre as massas seca de parte aérea, raiz e total observadas e o diâmetro das mudas para os dados observados, o que pode ser atribuído à não significância para as diferenças entre tratamentos observada para esta variável.

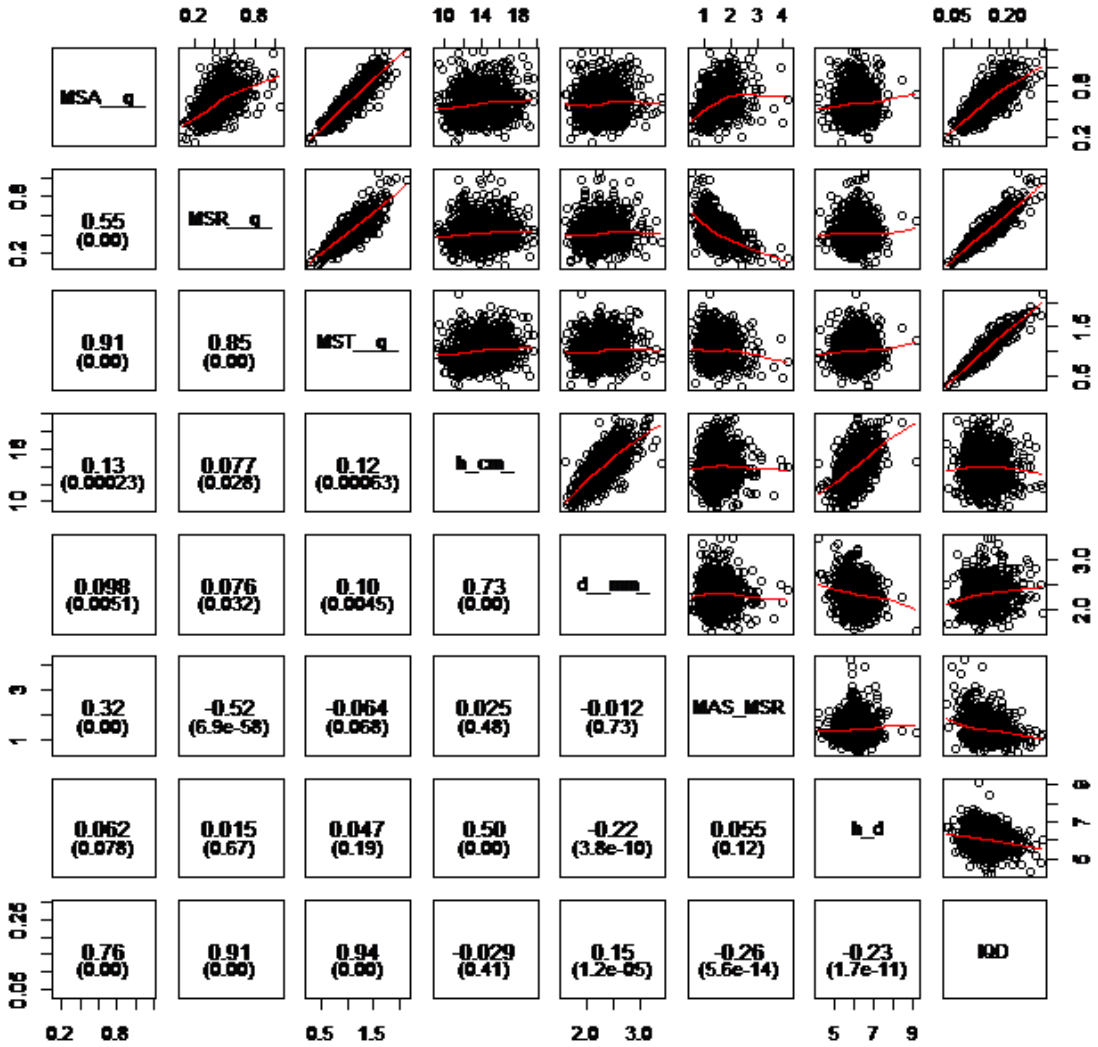

Figura 1 – Matriz de correlação entres as variáveis avaliadas no ensaio de seleção massal de isolados micorrízicos em *Pinus taeda*.
Entre parênteses é apresentado o p-valor, em que: se p-valor≥0,05, o coeficiente não é significativo; se 0,05<p-valor≤0,01, o coeficiente é significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; se p-valor<0,01, o coeficiente é significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

Com base nisso, os isolados selecionados para condução dos testes *in vitro* e de confirmação do efeito promotor de crescimento foram I14R e I51. O isolado I14R foi obtido de amostras de mudas que apresentavam torrão colonizado por fungos em viveiro, enquanto o isolado I51 é proveniente de serapilheira sob plantios que estavam com três anos de idade no momento da coleta. Para a variável altura o isolado I51 resultou em aumento da ordem de 21,01%, estatisticamente superior ao valor observado para o tratamento controle.

Para MST, os isolados apresentaram incrementos igual a 69,86% para ambos os isolados. Já em relação à MSR, a aplicação em substrato levou a incrementos de 157,41% e

140,6% para os isolados I51 e I14R, respectivamente. Mesmo com a microbiolização, que apresentou médias significativamente inferiores aos dos tratamentos com inoculação direta no substrato, o isolado I14R resultou em incremento significativo de 31,14%, enquanto o isolado I51, embora não estatisticamente diferente do tratamento controle, ainda resultou numa média 16,19% superior.

O sequenciamento do DNA fúngico revelou que os isolados selecionados para o teste de confirmação pertencem ao mesmo gênero fúngico, tendo sido identificados como: i) Isolado I14R – *Trichoderma* sp.; ii) Isolado I51 – *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg.

5. CONCLUSÕES

Os isolados fúngicos apresentam potencial de promoção de crescimento de mudas de *P. taeda*, aumentando a massa seca total e radicular, bem como a altura, das mudas.

Do processo de isolamento direto e indireto foram isolados um total de 100 fungos, dos quais 22 são provenientes de mudas do viveiro e 78 de serapilheira sob plantios comerciais de *P. taeda*. O método de *imprinting* demonstra ser uma boa técnica para o isolamento de serapilheira.

Selecionaram-se dois isolados para o ensaio de confirmação do efeito de promoção de crescimento, um proveniente de material coletado em viveiro, I14R, e um isolado coletado de serapilheira, I51, sob plantio de três anos de idade.

O melhor método para inoculação dos isolados fúngicos é a aplicação de suspensão celular direta no substrato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ-SANCHEZ, M.E.; HERNÁNDEZ-ACOSTA, E.; MALDONADO-TORRES, R.; RIVERA-GONZÁLEZ, M. Encalado y micorriza para corregir deficiencia de fósforo en un Andisol cultivado com *Pinus halepensis*. **Madera y Bosques**, v. 19, n. 1, p. 7-16, 2013.

AUER, C.G.; GHIZELINI, A.M.; PIMENTEL, I.D.; BIZI, R.M. Fungos em acículas da serapilheira de *Pinus taeda* L. em povoamentos com diferentes idades. **Floresta**, v. 36, n. 3, p. 433-438, 2006.

AUER, C.G.; SANTOS, A.F. Principais doenças em Pinus no Brasil e formas de controle. In: NEFIT – Núcleo de Estudos em Fitopatologia. **Patologia florestal: desafios e perspectivas**. 1. Ed. São Carlos: Suprema Gráfica e Editora, p.169-179, 2013.

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. ACIAR Monograph 32, 1996, 374 p.

CALDAS, R.G. Diferentes tipos de substratos na produção de mudas agroecológicas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* sims f. *flavicarpa* deg.). In: Congresso Brasileiro de Agroecologia, IV, **Anais...,** Belo Horizonte, 2006.

CARNEIRO, J.G.A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais.** Curitiba: UFPR/FUPEF, 1995, 451 p.

CARNEIRO, J.G.A.; BARROSO, D.G.; SOARES, L.M.S. Crescimento de mudas em raiz nua de *Pinus taeda* L., sob cinco espaçamentos no viveiro e seu desempenho no campo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 13, n. 3, p. 305-310, 2007.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 28-34, 2011.

CASTRILLÓN, M.; LEÓN, J.D.; CARVAJAL, D.; OSORIO, N.W. Effectiveness of single and combined ectomycorrhizal inocula on three species of *Pinus* at nursery. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, p. 169-179, 2015.

CONSTANTINO, V.; HIGA, A.R.; SILVA, L.D.; ROSA, J.M.C.; VIANA, J.J. Efeitos de métodos de produção de mudas e equipes de plantadores no crescimento de *Pinus taeda* Linnaeus. **Scientia Florestalis**, v. 38, n. 87, p. 355-366, 2010.

HARVEY, L.M. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. **Biotechnology Advances,** v. 9, p. 13-29, 1991.

KURAKOV, A.V.; NECHITAILO, T.Y.; GOLYSHIN, P.N.; ZVYAGINTSEV, D.G. Diversity of facultatively anaerobic microscopic mycelial fungi in soils. **Microbiology**, v. 77, n.1, p 90-98, 2008.

LAMHAMEDI, M.S.; BERNIER, P.Y.; FORTIN, J.A. Growth, nutrition and response to water stress of *Pinus pinaster* inoculated with ten dikaryotic strains of *Pisolithus* sp. **Tree Physiology,** v. 10, p. 153-167, 1992.

LUCON, C.M.M. Promoção de crescimento de plantas com uso de *Trichoderma* spp. **Comunicado Técnico – Instituto Biológico**, n. 94, 2009. Disponível em < http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=94> Acesso em 17 jan 2017.

MACHADO, D.F.M.; TAVARES, A.P.; LOPES, S.J.; SILVA, A.C.F. *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de Cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p, 167-176, 2015.

MARX, D.H.; RUEHLE, J.L.; CORDELL, C.E. Methods for studying nursery and field response of trees to specific ectomycorrrhiza. In: NORRIS, J.R.; READ, D.J.; VARNA, A.K. (Eds.) **Methods in Microbiology**. London: Academic Press, v. 23, p. 471-411, 1991.

NARLOCH, C. **Interação microrganismos solubilizadores de fosfatos - fungos ectomicorrízicos e o crescimento de *Pinus taeda* L.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2002. 171 p.

PEZZUTTI, R.V.; CALDATO, S.L. Sobrevivência e crescimento inicial de mudas de *Pinus taeda* L. com diferentes diâmetros de colo. **Ciência Florestal,** v. 21, n. 2, p. 355-362, 2011.

R CORE TEAM (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em <https://www.R-project.org/> Acesso em 13 abr 2016.

REGLÍNSKI, T.; RODENBURG, N.; TAYLOR, J.T.; NORTHCOTT, G.L.; AH CHEE, A.; SPIERS, T.M.; HILL, R.A. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. **Forest Pathology**, v. 42, p. 75-78, 2012.

REID, C.P.P.; KIDD, E.A.; EKWEBELAM, S.A. Nitrogen, nutrition, photosynthesis and carbon allocation in ectomycorrhizal pine. **Plant Soil**, v. 71, p. 415-432, 1983.

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

SILVA, R.F.; ANTONIOLLI, Z.I.; ANDREAZZA, R. Produção de mudas de *Pinus elliottii* Engelm. micorrizadas em solo arenoso. **Ciência Florestal,** v. 13, n. 2, p. 57-65, 2003.

SILVA, F.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.

CAPÍTULO 2: INOCULAÇÃO DE *Trichoderma* spp. COMO PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM *Pinus taeda*

1. INTRODUÇÃO

Mudas de qualidade são essenciais ao sucesso dos projetos florestais (PEZZUTTI e CALDATO, 2011). Embora avanços tecnológicos ocorreram na produção de mudas, a ausência de parâmetros de qualidade bem como erros técnicos em viveiros florestais são corriqueiros (CONSTANTINO et al., 2010). Assim requer pesquisas que busquem alternativas técnicas e científicas, como o uso de microrganismos promotores de crescimento para a melhor qualidade na produção de mudas.

Quanto aos fungos com potencial de promoção do crescimento de plantas citam-se as espécies do gênero *Trichoderma*. Esses fungos são habitantes do solo e formam associações mutualísticas benéficas com plantas e vem sendo estudados amplamente por atuarem tanto na promoção de crescimento, quanto como agentes de biocontrole de doenças (HARMAN, 2006; HOHMANN et al., 2011; REIS et al., 2013; MACHADO et al., 2015).

Trichoderma spp. já foram relatadas como antagonistas a *Botrytis cinerea* (FORTES et al., 2007), *Fusarium* spp. (MORAGA-SUAZO et al.; 2011; MACIEL et al., 2014) e *Phytophthora cinnamomi* Rands. (KELLEY, 1976), entre outros patógenos importantes. Também há estudos que comprovam o efeito como promotores de enraizamento em estacas de *Eucalyptus* sp. (FORTES et al., 2007), produtores de ácido indol-acético (AIA), solubilizadores de fosfato (OLIVEIRA et al., 2012) bem como de minerais pouco ou insolúveis (ALTORMARE et al.; 1999), e até na quebra de dormência de sementes (DONG et al., 1987).

Entretanto, apesar dessa interação entre plantas e microrganismos ser uma alternativa sustentável, e da ampla contribuição de *Trichoderma* spp. para culturas agrícolas, há poucos trabalhos envolvendo esses fungos e árvores (DONOSO et al., 2008; HOHMANN et al., 2011; MACHADO et al., 2015). Em espécies florestais, estudos concluíram que os fungos do gênero *Trichoderma* podem promover o crescimento das plantas inclusive em ambientes degradados, atuando como fitorremediadores em áreas cujo solo está contaminado (ADAMS et al., 2007; BABU et al. 2014), ressaltando assim a importância de se estudar as associações entre *Trichoderma* spp. e espécies arbóreas de interesse comercial ou mesmo para recomposição florestal em áreas antropizadas.

Com base no exposto, o presente capítulo visa apresentar os resultados da avaliação do efeito promotor de crescimento de dois isolados de *Trichoderma* spp. inoculados em mudas de *P. taeda*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Confirmar o efeito promotor de crescimento de dois isolados fúngicos do gênero *Trichoderma* inoculados em mudas seminais de *P. taeda*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Avaliar o efeito da inoculação de isolados fúngicos nas variáveis biométricas em mudas de *P. taeda*;

ii) Avaliar o melhor momento para aplicação dos isolados fúngicos promotores de crescimento em mudas seminais de *P. taeda*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PRODUÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados fúngicos promotores de crescimento foram obtidos da micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da UNICENTRO. Os isolados são provenientes de isolamento a partir de material de viveiro (Isolado I14R) e áreas de plantios comerciais de *P. taeda* com três anos de idade da região dos Campos Gerais do Estado do Paraná (Isolado I51). A análise molecular identificou os isolados como: i) Isolado I14R – *Trichoderma* sp.; ii) Isolado I51 – *Trichoderma asperellum*.

Os dois isolados foram cultivados em meio de Merlin Norkrans adaptado (HARVEY, 1991; BRUNDRETT et al., 1996), incubados em estufa tipo BOD (*Biochemical Oxygen* Demand) a 25 ºC (±2 ºC) por 30 dias para execução dos demais ensaios.

3.2. PRODUÇÃO DE MUDAS SEMINAIS DE *P. taeda* MEDIADA POR *Trichoderma* spp.

O efeito dos isolados selecionados na seleção massal para produção de mudas seminais de *P. taeda* foi avaliado por meio de ensaio delineado em blocos casualizados (DBC) em esquema fatorial 3x2 (isolados+controle x métodos de aplicação), com 10 blocos e cinco plantas por repetição. Os fatores avaliados foram:

i) Isolado (fator com três níveis) – tratamentos sem aplicação de micorrizas, isolados I14R e I51;

ii) Modo de aplicação (fator com dois níveis) – inoculação direta no substrato da suspensão de micorrizas no momento da montagem do ensaio (M1) e inoculação direta no substrato da suspensão de micorrizas aos 30 dias após a semeadura (M2).

A aplicação após 30 dias da semeadura visa observar se o estabelecimento prévio das plantas no substrato gera diferenças no efeito da interação entre os isolados e as mudas. O experimento apresentou cinco tratamentos, apresentados no Quadro 1.

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
Tratamento 0 (T0)	Tratamento controle – sem inoculação de isolados.
Tratamento 1 (T1)	Inoculação direta no substrato da suspensão do isolado selecionado I14R no momento da semeadura.
Tratamento 2 (T2)	Inoculação direta no substrato da suspensão do isolado selecionado I51 no momento da semeadura.
Tratamento 3 (T3)	Inoculação direta no substrato da suspensão do isolado selecionado I14R, 30 dias após a semeadura.
Tratamento 4 (T4)	Inoculação direta no substrato da suspensão do isolado selecionado I51, 30 dias após a semeadura.

Quadro 1 – Tratamentos referentes ao ensaio de inoculação fúngica para produção de mudas seminais de *P. taeda.*

Foram semeados 50 tubetes por tratamento, num total de 250 tubetes de 55 cm³. As sementes utilizadas são provenientes de pomar de sementes de 2ª geração da região norte do Estado de Santa Catarina, obtidas por doação. As suspensões dos isolados fúngicos foram ajustadas para concentração igual a 10^7 propágulos por mililitro e foram aplicados 10 mL de suspensão celular por muda. A avaliação das mudas foi realizada aos 150 dias, em que se observaram os seguintes parâmetros:

a) Altura de mudas (cm) medida com auxílio de régua milimetrada;

b) Diâmetro do coleto (mm) obtido por meio de paquímetro digital;

c) Massa seca de parte aérea e de raiz (g);

d) Relação entre altura e diâmetro de coleto;

e) Índice de Qualidade de Dickson (IQD).

O incremento em relação ao tratamento controle foi calculado com base na expressão $I = [(x_i - x_0)/x_0]*100$ (Eq. 1), em que x_i é o dado do tratamento e x_0 é o dado relativo ao tratamento controle.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, procedeu-se a análise exploratória dos dados com o objetivo de averiguar as pressuposições básicas e necessárias para as análises estatísticas, verificando a necessidade de transformação dos dados. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio de planilha eletrônica e o pacote estatístico Assistat Beta 7.6 (SILVA e AZEVEDO, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variável massa seca radicular (MSR) foi a única variável que apresentou interação estatisticamente significativa entre os fatores. Para as variáveis diâmetro de coleto, altura, massa seca de parte aérea (MSA), massa seca total (MST) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD) houve diferenças estatisticamente significativas apenas entre os níveis do fator isolado (F1). A relação h/d não apresentou diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8 – Resultados da ANOVA para os fatores estudados (modo de aplicação e isolados) e interação entre estes para o ensaio de inoculação dos isolados de *Trichoderma* spp.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	Diâmetro de coleto (mm)	Altura (cm)	Relação h/d	MSA (g)	MSR (g)	MST (g)	IQD
		QUADRADO MÉDIO						
Isolados (Fator 1)	1	0,08142*	15,90000**	7,73522^{ns}	0,00448*	0,00010**	0,00592**	0,00001**
Modo de aplicação (Fator 2)	2	0,00165^{ns}	1,08900^{ns}	5,93278^{ns}	0,00005^{ns}	0,00000^{ns}	0,00007^{ns}	0,00000^{ns}
Interação (Fator 1 x Fator 2)	2	0,00055^{ns}	0,60164^{ns}	4,70894^{ns}	0,00004^{ns}	0,00005*	0,00016^{ns}	0,00000^{ns}
Tratamentos	5	0,03312^{ns}	6,81845*	6,16420^{ns}	0,00182**	0,00006**	0,00245**	0,00000*
Blocos	9	0,02101^{ns}	5,69316*	32,2957^{ns}	0,00021^{ns}	0,00002^{ns}	0,00026^{ns}	0,00000^{ns}
Erro	45	0,02181	2,36620	16,43125	0,00038	0,00001	0,00045	0,00000
Coeficiente de Variação (%)		20,70	11,33	19,09	17,78	14,14	15,92	23,21
Qui-quadrado (χ^2)		1,4962	7,2380	4,4691	2,7475	6,1743	4,2696	4,4691

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($\alpha \leq 0,01$); * Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq \alpha \leq 0,05$); ^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Apenas o isolado I51 (*T. asperellum*) apresentou efeito promotor de crescimento sobre as mudas seminais de *P. taeda*, em todas as variáveis, enquanto que o isolado I14R (*Trichoderma* sp.) não apresentou diferenças estatísticas em relação ao tratamento controle (Tabela 9). O maior incremento observado com a inoculação do isolado I51 em relação ao tratamento controle se deu para a variável observada IQD (29,16%), seguido de MST (26,89%), MSA (27,96%), diâmetro de coleto (17,91%) e altura de parte aérea (12,31%).

Tabela 9 – Resultado do teste de médias de Tukey para o fator Isolado (F1) para as variáveis diâmetro de coleto (D), altura de parte aérea (H), massa seca de parte aérea (MSA), massa seca total (MST) e Índice de Qualidade de Dickson (IQD), em *P. taeda*.

Modo de aplicação (F2)	**D(mm)**		**H(cm)**		**MSA(g)**		**MST(g)**		**IQD**	
Controle[1]	0,67	b	13,0	b	0,0987	B	0,1216	b	0,0048	b
I14R	0,68(1,49)	b	13,1(1,00)	b	0,1026(3,95)	B	0,1267(4,19)	b	0,0051(0,03)	b
I51	0,79(17,91)	a	14,6(12,31)	a	0,1263(27,96)	A	0,1543(26,89)	a	0,0062(29,16)	a

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de probabilidade de erro de 5%.
[1]Sem inoculação de isolados.
Entre parênteses está o valor do incremento percentual.

Para MSR pode-se observar que a aplicação dos isolados no substrato no momento da semeadura não resultou em valores estatisticamente diferentes entre os

isolados e o tratamento controle. Já a aplicação aos 30 dias da semeadura resultou num efeito positivo significativo para a inoculação do isolado I51, em relação aos demais tratamentos, com incremento igual a 26,09% em relação ao tratamento controle (Tabela 10). Infere-se por este resultado que, para o isolado I51 o estabelecimento prévio da planta no substrato favoreceu a interação positiva entre o isolado e o sistema radicular da mesma. Reglínski et al. (2012) também observaram que a inoculação dos isolados de *T. atroviride* no substrato de mudas já estabelecidas de *P. radiata*, aos quatro meses de idade, resultou em maior biomassa de raiz e de parte aérea em relação ao tratamento controle.

Tabela 10 - Resultado do teste de médias de Tukey para a interação entre o fator Isolado (F1) e o modo de aplicação (F2) para a variável massa seca radicular (MSR), em gramas.

Modo de Aplicação	**Isolado (F1)**		
(F2)	**Controle**	**I14R (*Trichoderma* sp.)**	**I51 (*T. asperellum*)**
Substrato – 0 dia	0,0230 aA	0,0252 aA	0,0255 bA
Substrato – 30 dias	0,0230 aB	0,0227 aB	0,0290 aA

Letras maiúsculas diferenciam os isolados para um mesmo modo de aplicação e letras minúsculas diferenciam a performance do isolado entre os modos de aplicação, ao nível de probabilidade de 5%.

Diversos são os modos de ação de *Trichoderma* spp. que levam a promoção de crescimento das plantas quando em associação ao seu sistema radicular, como o controle de patógenos radiculares ou foliares pela indução de resistência ou biocontrole direto, alterações na microflora radicular, aumento na absorção de nutrientes e na solubilização dos mesmos e aumento no desenvolvimento radicular (HARMAN, 2006). Assim, a presença das mudas já estabelecidas no substrato no momento da inoculação favoreceu a interação entre isolado I51 e sistema radicular, levando ao efeito favorável sobre a MSR.

Apesar de escassos, alguns estudos conduzidos com outras espécies lenhosas também demonstram uma relação positiva entre a inoculação com *Trichoderma* spp. e o aumento de massa seca aérea e radicular de mudas. Bae et al. (2009), estudando o efeito benéfico do isolado DIS 219b em mudas de *Theobroma cacao* L. em diferentes regimes hídricos, observaram que a inoculação do isolado foi consistentemente associada ao aumento na massa seca e fresca de raiz e total, independente do ciclo hídrico utilizado. Machado et al. (2015) avaliaram o efeito da inoculação de isolados de *Trichoderma* spp. sobre o crescimento de mudas de cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera) e observaram efeito positivo para massa fresca e seca de parte aérea e raiz.

Quanto ao incremento observado para as mudas de *P. taeda* com a inoculação do isolado I51, os valores encontram-se dentro do já observado para outras espécies de *Pinus*.

Em mudas de *P. radiata*, Hohmann et al. (2011) avaliaram a habilidade de promoção de crescimento de duas espécies, *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier e *T. atroviridei,* isolados do solo de duas áreas distintas e em anos diferentes. O isolado de *T. hamatum* apresentou efeito positivo na sanidade das plantas, reduzindo significativamente a mortalidade de mudas em 29%, além de promover o crescimento de parte aérea com um incremento de 16% na altura e 31% de aumento na massa seca radicular. Em contraste, *T. atroviride* não teve impacto nas mudas de *P. radiata.*

Reglínski et al. (2012) estudaram o efeito de quatro isolados de *T. atroviride* no crescimento de mudas de *P. radiata,* inoculando os isolados diretamente no substrato quando as mudas tinham quatro meses de idade. Após seis meses da inoculação, não houve efeito significativo na altura das plantas, porém a biomassa de raiz apresentou aumento entre 40-50% em relação ao tratamento controle. Para massa seca de parte aérea, os autores observaram efeito positivo com incrementos superiores a 25% em relação ao tratamento controle.

O fato de o isolado I14R não ter diferido estatisticamente do tratamento controle pode ser atribuído a fatores como diferenças no ambiente de teste, no substrato utilizado, disponibilidade de nutrientes e mesmo a interferência de outros microrganismos, dado que os mecanismos de ação dos fungos promotores do crescimento vegetal são específicos e sofrem influência destas variáveis (RABEENDRAN et al., 2000; MACHADO et al., 2015). Rabeendran et al. (2000) observaram em *Brassica oleracea* L. (repolho) o efeito promotor observado pelo incremento na área foliar, massa radicular e de parte aérea não foi obtido num segundo ensaio em função de alterações nas condições ambientais.

Ilustrando o efeito do substrato na interação planta-microrganismo, Donoso et al. (2008) avaliaram a promoção de crescimento em mudas de *P. radiata* após a inoculação de *Trichoderma harzianum* Rifai em relação à mudança da composição do substrato. Como resultados, os autores observaram uma interação positiva significativa entre a presença do fungo associada ao aumento da proporção de composto orgânico no substrato e o aumento na altura e biomassa das plantas, bem como no desenvolvimento radicial, indicando a forte influência dos fatores ambientais no sucesso do estabelecimento de um efeito benéfico.

Assim, os resultados obtidos neste experimento indicam a necessidade de, ao selecionar isolados de *Trichoderma* spp. com potencial promotor de crescimento pensando na produção comercial de mudas florestais, trabalhar com as condições do

viveiro em que os mesmos serão utilizados ou ainda, se o objetivo é obter um produto biológico comercial a base de *Trichoderma*, testar vários isolados em diversas situações, combinando diferentes substratos, regimes hídricos e espécies florestais, a fim de se selecionar o isolado com o comportamento mais cosmopolita o possível.

5. CONCLUSÕES

A inoculação do isolado I51 (*T. asperellum*) teve efeito promotor de crescimento sobre as variáveis avaliadas em mudas de *P. taeda*.

O isolado I14R não apresenta efeito promotor de crescimento em mudas seminais de *P. taeda*.

A melhor época para a inoculação do isolado I51 é após 30 dias da semeadura, com as plântulas já estabelecidas no substrato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, P.; DE-LEIJ, F.A.A.M.; LYNCH, J.M. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 Mediates Growth Promotion of Crack Willow (*Salix fragilis*) Saplings in Both Clean and Metal-Contaminated Soil. **Microbial Ecology**,v. 54, p. 306-313, 2007.

ALTOMARE, C.; NORVELL, W.A.; BJÖRKMAN, T.; HARMAN, G.E. Solubilization of Phosphates and Micronutrients by the Plant-Growth-Promoting and Biocontrol Fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 2926-2933, 1999.

BABU, A.G.; SHEA, P.J.; OH, B. *Trichoderma* sp. PDR1-7 promotes *Pinus sylvestris* reforestation of lead-contaminated mine tailing sites. **Science of the Total Environment**, v. 476-477, p. 461-567, 2014.

BAE, H.; SICHER, R.C.; KIM, M.S.; KIM, S.; STREM, M.D.; MELNICK, R.L.; BAILEY, B.A. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 11, p. 3279-3295, 2009.

BRUNDRETT, M.; BOUGHER, N.; DELL, B.; MALAJCZUK, N. **Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture**. ACIAR Monograph 32, 1996, 374 p.

OLIVEIRA, A.G.; CHAGAS JÚNIOR, A.F.; SANTOS, G.R.; MILLER, L.O.; CHAGAS, L.F.B. Potencial de solubilização de fosfato e produção de AIA por *Trichoderma* spp. **Revista Verde,** v. 7, n. 3, p. 149-155, 2012.

CONSTANTINO, V., HIGA, A.R.; SILVA, L.D.; ROSA, J.M.C.; VIANA, J.J. Efeitos de métodos de produção de mudas e equipes de plantadores no crescimento de *Pinus taeda* Linnaeus. **Scientia Florestalis**, v. 38, n. 87, p. 355-366, 2010.

DONG, L.; ZHANG, X.; ZHANG, H. Breaking seed dormancy of *Pinus bungeana* Zucc. With *Trichoderma*.4030 inoculations. **New Forests**, v. 3, p. 245-249, 1987.

DONOSO, E.; LOBOS, G.A.; ROJAS, N. Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crescimento de plântulas de *Pinus radiata* em viveiro. **Bosque**, v. 29, n. 1, p. 52-57, 2008.

FORTES, F.O.; SILVA, A.C.F.; ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore,** v. 31, n. 22, p. 221-228, 2007.

HARMAN, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HARVEY, L.M. Cultivation techniques for the production of ectomycorrhizal fungi. **Biotechnology Advances,** v. 9, p. 13-29, 1991.

HOHMANN, P.; JONES, E.E.; HILL, R.A.; STEWART, A. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**, v. 115, p. 759-767, 2011.

KELLEY, W.D. Evaluation of *Trichodera harzianum*-impegnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamomic* causing damping-off of pine seedlings. **Phytopathology**, v. 66, p. 1023-1027, 1976.

LUCON, C.M.M. Promoção de crescimento de plantas com uso de *Trichoderma* spp. **Comunicado Técnico – Instituto Biológico**, n. 94, 2009. Disponível em < http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=94> Acesso em 17 jan 2017.

MACHADO, D.F.M.; TAVARES, A.P.; LOPES, S.J.; SILVA, A.C.F. *Trichoderma* spp. na emergência e crescimento de mudas de Cambará (*Gochnatia polymorpha* (Less.) Cabrera). **Revista Árvore**, v. 39, n. 1, p, 167-176, 2015.

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

MORAGA-SUAZO, P.; OPAZO, A.; ZALDÚA, S.; GONZÁLEZ, G.; SANFUENTES, E. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. 3, p. 412, 2011.

PEZZUTTI, R.V.; CALDATO, S.L. Sobrevivência e crescimento inicial de mudas de *Pinus taeda* L. com diferentes diâmetros de colo. **Ciência Florestal,** v. 21, n. 2, p. 355-362, 2011.

RABEENDRAN, N.; MOOT, D.J.; JONES, E.E.; STEWART, A. Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. **New Zealand Plant Protection**, v. 53, p. 143-146, 2000.

REGLÍNSKI, T.; RODENBURG, N.; TAYLOR, J.T.; NORTHCOTT, G.L.; AH CHEE, A.; SPIERS, T.M.; HILL, R.A. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. **Forest Pathology**, v. 42, p. 75-78, 2012.

REIS, M.R. LEÃO, E.U.; SANTOS, G.R.; SARMENTO-BRUM, R.B.C; GONÇALVES, C.G.; CARDON, C.H.; SILVA, D.B. Impacto de herbicidas em isolados de *Trichoderma* spp. **Planta Daninha,** v. 31, n. 2, p. 419-426, 2013.

SILVA, F.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.

CAPÍTULO 3: CONTROLE BIOLÓGICO DE *Fusarium proliferatum* POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. EM *Pinus taeda*

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios para a atualidade é alcançar o equilíbrio para uma produção sustentável, sabendo que a demanda tanto por alimentos quanto por produtos básicos, como a celulose e madeira para energia por exemplo, é crescente (BERG, 2009). Neste escopo, a utilização da biotecnologia configura como uma alternativa viável para o aumento e manutenção da produtividade das culturas de interesse. Diversos microrganismos associados às plantas podem ser explorados como antagonistas a patógenos importantes como, por exemplo, rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) (FREITAS, 2007), bactérias residentes de filoplano (HALFELD-VIEIRA et al., 2014), fungos do gênero *Trichoderma* (FORTES et al., 2007; REIS et al., 2013; MACIEL et al., 2014) e micorrizas (MARX, 1970; MARX, 1973; ATLAS e BARTHA, 1998; BRUNDRETT, 2004).

As espécies do gênero fúngico *Trichoderma* vem sendo exploradas intensamente como biocontroladores a patógenos ao longo dos anos. *Trichoderma* spp. são fungos do solo que formam associações mutualísticas benéficas com plantas e têm sido estudados tanto como promotores de crescimento, quanto como agentes de biocontrole de doenças e indutores de resistência a doenças em plantas (HARMAN, 2006; HOHMANN et al., 2011; REIS et al., 2013; MACHADO et al., 2015).

A supressão de doenças de plantas por *Trichoderma* spp. resulta do antagonismo direto através de competição, antibiose e parasitismo ou então de forma indireta pela indução à resistência na planta ao ataque do patógeno quando associados ao sistema radicular, fator essencial para determinar o potencial de controle de patógenos dos isolados de *Trichoderma* spp. (HARMAM, 2006; HOHMANN et al., 2011).

Pesquisas relatando o efeito biocontrolador *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. sobre patógenos importantes como *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. (BELL et al., 1982; MISHRA, 2010), *Fusarium* spp. (LAZAROTTO et al., 2012), *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Ceratobasidium cornigerum* (Bourdot) D.P. Rogers, *Phytophthora parasitica* f. *nicotianae* (Breda de Haan) Tucker, *Pythium myriotylum* Drechsler e *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn (BELL et al., 1982), *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. (BOMFIM, 2007) podem ser observados amplamente na literatura. Contudo,

comparativamente às culturas agrícolas, poucos estudos envolvendo o potencial de biocontrole de doenças *in vivo* em espécies florestais podem ser encontrados (REGLÍNSKI et al., 2012), podendo ser citados trabalhos com *Trichoderma* spp. como antagonistas a *B. cinerea* em *Eucalyptus* sp. (FORTES et al., 2007), *F. sambucinum* em *P. elliottii* (MACIEL et al., 2014), *F. circinatum* em *P. radiata* (MORAGA-SUAZO et al.; 2011), *P. cinnamomi* em *P. echinata* (KELLEY, 1976), *Cylindrocladium candelabrum* Viégas em *Eucalyptus saligna* Sm. (MACIEL et al., 2012).

As sementes são importantes veículos de agentes fitopatogênicos, que podem atuar sobre as mesmas reduzindo germinação ou o vigor das plântulas. As estruturas dos microrganimos fitopatogênicos podem permanecer viáveis nas sementes mesmo durante o armazenamento, consistindo no inóculo primário de infecções que podem evoluir para epidemias (SILVA et al., 2008; CARVALHO et al., 2011). Dentre os gêneros fúngicos causadores de diversas doenças nas mais diversas culturas, agrícolas ou florestais, o gênero *Fusarium*, encontra-se associado a sementes de diversas espécies, como *Pinus* spp. (MENDES et al., 1998; MACIEL et al., 2014) e *Phaseolus vulgaris* L. (feijoeiro comum) (CARVALHO et al., 2011), por exemplo, causando *damping-off* pré e pós-emergência das plântulas.

Com base no exposto, o presente capítulo visa apresentar os resultados obtidos na avaliação do biocontrole *in vitro* e *in vivo* por isolados de *Trichoderma* spp. sobre o patógeno *F. proliferatum* em *P. taeda*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o biocontrole de *F. proliferatum* por isolados fúngicos promotores de crescimento em *P. taeda.*

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i) Avaliar o biocontrole *in vitro* de *F. proliferatum* pelos isolados fúngicos promotores de crescimento;

ii) Avaliar o biocontrolde *in vivo* de *F. proliferatum* pela inoculação direta no substrato dos isolados fúngicos de *Trichoderma* spp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ISOLADOS PROMOTORES DE CRESCIMENTO

Os isolados fúngicos agentes de biocontrole foram obtidos da micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da UNICENTRO. Os isolados são provenientes de isolamento a partir de material de viveiro (Isolados I14R) e áreas de plantios comerciais de *P. taeda* com três anos de idade da região dos Campos Gerais do Estado do Paraná (Isolado I51). A análise molecular identificou os isolados como: i) Isolado I14R – *Trichoderma* sp.; ii) Isolado I51 – *T. asperellum*.

3.2. ISOLADO PATOGÊNICO

O isolado patogênico foi obtido a partir de teste de sanidade de sementes de *P. taeda*, provenientes da região Centro-Sul do Estado do Paraná, cuja metodologia seguiu as recomendações de MAPA (2009). As sementes em que se observou a presença de micélio foram colocadas em câmara úmida e, posteriormente, o micélio foi transferido assepticamente para placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), sendo incubado em estufas do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 25±2ºC e fotoperíodo de 12 h. Culturas puras obtidas a partir das colônias cultivadas foram então enviadas para análise molecular que revelou que o isolado pertence à espécie *F. proliferatum*, devidamente depositado na micoteca do Laboratório de Patologia Florestal da UNICENTRO – *Campus* Irati.

3.3. ENSAIO DE CONFRONTAÇÃO DIRETA *IN VITRO*

3.3.1. Montagem do ensaio de confrontação direta *in vitro*

O ensaio de confrontação direta *in vitro* foi conduzido de acordo com a metodologia apresentada por Milanesi (2009). Primeiramente os isolados antagonistas (I14R e I51) e o *F. proliferatum* foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA, até a total cobertura da superfície do meio, em estufa do tipo BOD a 25±2ºC e fotoperíodo de 12 h.

Um disco de meio de cultura BDA de 10 mm de diâmetro contendo micélio de *F. proliferatum* foi transferido para placas de Petri (60 mm de diâmetro), também contendo meio BDA, as quais foram então incubadas durante 48 horas a 25±2°C e fotoperíodo de 12 h. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA com 10 mm de diâmetro contendo micélio dos isolados antagonistas foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *F. proliferatum* nas placas de Petri. As placas foram então incubadas durante sete dias a 25 ± 2°C e fotoperíodo de 12 h. Como tratamento controle foram utilizadas placas, nas mesmas condições descritas, contendo apenas o patógeno.

Para cada confronto, foram feitas dez repetições, onde cada repetição foi representada por uma placa de Petri.

3.3.2. Avaliação do ensaio de confrontação direta *in vitro*

Ao fim do período de incubação, as placas foram avaliadas de acordo com a escala proposta por Bell et al. (1982), atribuindo notas que variaram de 1 a 5: i) Nota 1 – antagonista cresce e ocupa toda a placa; ii) Nota 2 – antagonista cresce e ocupa uma parte do patógeno (2/3 da placa); iii) Nota 3 – antagonista e patógeno crescem até a metade da placa (nenhum domina o outro); iv) Nota 4 – patógeno cresce e ocupa uma parte do antagonista (2/3 da placa); v) Nota 5 – patógeno cresce e ocupa toda a placa.

Para avaliação da escala de notas utilizada, notas próximas a 3 são consideradas neutras enquanto que se a nota observada for menor que 2 ou inferior considera-se que há efeito antagonista entre o patógeno e agente antagonista potencial, sendo ideal notas mais próximas a 1 (LAZAROTTO et al., 2012). Também se mediu, com auxílio de paquímetro digital, o crescimento micelial de cada fungo.

3.3.3. Delineamento do ensaio

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com dez repetições para cada tratamento. Primeiramente, procedeu-se a análise exploratória dos dados com o objetivo de averiguar as pressuposições básicas e necessárias para as análises estatísticas, verificando a necessidade de transformação dos dados. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de médias de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio de planilha eletrônica e o pacote estatístico Assistat Beta 7.6 (SILVA e AZEVEDO, 2009).

3.4. ENSAIO DE CONTROLE BIOLÓGICO *IN VIVO*

3.4.1. Montagem do ensaio de controle biológico *in vivo*

Para o ensaio de controle biológico *in vivo* foram utilizadas sementes de *P. taeda* obtidas por doação e provenientes de pomar de 2ª geração da região norte de Santa Catarina. As sementes foram, primeiramente, desinfestadas por 3 minutos em álcool 70%, seguida de 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio 2% e enxágue em água deionizada esterilizada, conforme Romeiro (2007). O método de inoculação do patógeno nas sementes foi por contato direto, em placas de Petri com meio BDA contendo cultura de *F. proliferatum*, em ambiente asséptico em câmara de fluxo laminar vertical. As placas com as sementes foram incubadas por 48 h (LAZAROTTO et al., 2010) em estufa tipo BOD a 25±2ºC e fotoperíodo de 12 h.

Para crescimento dos isolados antagonistas empregou-se o meio de cultura BDA. Os isolados foram colocados para crescer em estufa tipo BOD a 25±2ºC e fotoperíodo de 12 h por 30 dias. Dessas placas foram obtidas as suspensões celulares em concentração igual a 10^7 propágulos por mL de suspensão, ajustadas com auxílio de hemacitômetro.

A semeadura foi realizada em bandejas de isopor contendo 288 células de 7,93 cm^3 de volume cada. As células foram preenchidas com substrato comercial autoclavado, composto por turfa, perlita e calcário calcítico aditivado com fertilizante mineral. Cada célula correspondente aos tratamentos com os antagonistas foi inoculada com 1,4 mL de suspensão celular e então procedeu-se a semeadura. As bandejas foram mantidas sob luz natural e temperatura ambiente no Laboratório de Patologia Florestal da UNICENTRO – *Campus* Irati, por 42 dias, quando se realizou a avaliação final.

3.4.2. Delineamento do ensaio

Para avaliação do biocontrole *in vivo* foi empregue um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e cinco tratamentos (Quadro 2). Cada repetição foi constituída por 25 sementes, num total de 100 sementes analisadas por tratamento, conforme as recomendações adaptadas de MAPA (2009).

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO
Tratamento 0 - T_0	Tratamento controle: sementes desinfestadas sem inoculação do patógeno; substrato sem inoculação dos antagonistas.
Tratamento 0_{in} – T_{0in}	Tratamento controle inoculado: sementes com inoculação do patógeno por 48 h; substrato sem inoculação dos antagonistas.
Tratamento 1 – T_1	Sementes com inoculação do patógeno por 48 h; substrato com inoculação do antagonista I14R.
Tratamento 2 – T_2	Sementes com inoculação do patógeno por 48 h; substrato com inoculação do antagonista I51.

Quadro 2 - Tratamentos referentes ao ensaio de controle biológico *in vivo*.

Foram avaliados o percentual de plântulas emergidas, percentual de sementes mortas, percentual de plântulas normais e anormais, comprimento total médio das plântulas normais, bem como massa seca total produzida das plântulas normais. Por plântulas normais entendeu-se aquelas plantas saudáveis que apresentaram formação de parte aérea e raiz normal, sem sintomas e sinais da doença; do contrário, plântulas que morreram ou apresentaram alguma característica anômala ao considerado normal (quadro sintomatológico característico), foram classificadas como anormais.

Primeiramente, procedeu-se a análise exploratória dos dados com o objetivo de averiguar as pressuposições básicas e necessárias para as análises estatísticas, verificando a necessidade de transformação dos dados. Os dados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de médias de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio de planilha eletrônica e o pacote estatístico Assistat Beta 7.6 (SILVA e AZEVEDO, 2009).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ENSAIO DE CONFRONTAÇÃO DIRETA *IN VITRO*

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos na ANOVA para o ensaio de confrontação direta *in vitro* entre os isolados de *Trichoderma* spp. I14R e I51 e o patógeno *F. proliferatum*. Como pode ser observado, houve elevada significância entre os tratamentos.

Tabela 11 – Resultados da ANOVA para a nota do ensaio de confrontação direta *in vitro* e crescimento micelial dos antagonistas e patógeno

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	Nota do ensaio de confrontração	Crescimento micelial do Patógeno (mm)	Crescimento micelial do Antagonista (mm)
		QUADRADO MÉDIO		
Tratamentos	2	41,73**	25.170,03**	25.170,03**
Erro	27	0,27	2.456,50	2.456,50
Coeficiente de Variação (%)	29	19,36	32,21	23,62
Estatística Q		0,50000	0,55119	0,55119

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($\alpha \leq 0,01$); * Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 \leq \alpha \leq 0,05$); ^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Em relação a todas as variáveis observadas no ensaio de confrontação direta, os isolados antagonistas foram estatisticamente diferentes entre si e também do tratamento controle (Tabela 12). A menor nota e, portanto, a maior eficiência no controle *in vitro* do crescimento do patógeno foi observada com o isolado I51 (1,2), indicando uma forte ação de antagonismo entre os isolados testados, o que é indicado pelo pequeno crescimento micelial médio observado para o patógeno (3,50 mm) frente ao antagonista (66,5 mm). O isolado I14R apresentou uma eficiência no controle significativamente menor (1,8), com uma média de crescimento micelial do patógeno igual a 15,33 mm frente a média de 54,67 mm do antagonista, mas ainda assim ocupando a maior parte da superfície do meio de cultura na placa. O fato de ambos os isolados diferirem estatisticamente do tratamento controle, cuja nota foi igual a 5, indica que eles foram eficientes, embora em diferentes graus, no controle do crescimento de *F. proliferatum* e, portanto, apresentam potencial biocontrolador para condução de testes *in vivo*.

Tabela 12 - Resultado do teste de médias de Tukey para a nota do ensaio de confrontação direta *in vitro* e crescimento micelial dos antagonistas e patógeno.

Tratamento	**Nota do ensaio de confrontação**		**Crescimento micelial do Patógeno (mm)**		**Crescimento micelial do Antagonista (mm)**	
Controle[1]	5,0	a	70,00	a	0,00	a
I14R	1,8	b	15,33	b	54,67	b
I51	1,2	c	3,50	c	66,50	c

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de probabilidade de 5%.
[1] Crescimento do patógeno sem a presença do antagonista na placa de Petri.

A redução observada no crescimento da colônia do patógeno quando na presença de isolados de *Trichoderma* spp. *in vitro* pode ser atribuída a liberação de metabólitos extracelulares, voláteis ou não, que inibem o desenvolvimento destes microrganismos,

um dos principais mecanismos de ação de fungos do gênero *Trichoderma* (HARMAN et al., 2004; BOMFIM, 2007). A competição é uma das principais características dos isolados de *Trichoderma* spp. devido a rápida taxa de crescimento micelial, cerca de 0,33 $mm.h^{-1}$ (MORETTO et al., 2001; HOWELL, 2003).

A literatura relata o biocontriole de *Fusarium* spp. por *Trichoderma* spp., em situações semelhantes às encontradas no presente trabalho. Lazarotto et al. (2012) empregaram a metodologia de confrontação direta para seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp., obtidos de raízes de nogueira-pecan (*Carya illinoiensis* K. Koch.) com potencial de antagonismo a seis isolados patogênicos de *Fusarium* spp., obtidos também de folhas e raízes de nogueira-pecan. Os autores observaram que, num panorama geral, dois dos três isolados apresentaram efeito antagonista mais pronunciado contra os fitopatógenos (notas inferiores ou iguais a 2). Matos et al. (2014) avaliaram cinco isolados de quatro espécies de *Trichoderma* (*T. viride* Pers., *T. harzianum*, *T. polysporum* (Link) Rifai e *T. guttiforme*) como antagonistas a *Fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell, causador de fusariose em abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.) e os resultados indicaram que todos os isolados de *Trichoderma* spp. inibiram o crescimento micelial de *F. guttiforme in vitro*.

É necessário, entretanto, ressaltar que para cada isolado patogênico a interação com o antagonista tende a ser diferente em função de variações inter e intraespecíficas, sendo, portanto, necessário que a seleção do agente antagonista potencial seja feita para cada isolado patogênico especificamente (BELL et al., 1982; HARMAN et al, 2004; LAZAROTTO et al., 2012). Harman et al. (2004) citam que as espécies de *Trichoderma* podem ser biocontroladores seletivos, com resultados variáveis em função do isolado e sua adaptação às condições ambientais. Assim o efeito de antagonismo *in vitro* dos isolados I51 e I14R sobre outros fungos, mesmo que pertencentes ao gênero *Fusarium*, deve ser testado individualmente, a fim de se garantir o potencial dos mesmos sobre o biocontrole de outros patógenos.

4.2. ENSAIO DE CONTROLE BIOLÓGICO *IN VIVO*

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos na ANOVA para o ensaio de controle biológico *in vivo*, em *P. taeda*, entre os isolados de *Trichoderma* spp. I14R e I 51 e o patógeno *F. proliferatum*. Como pode ser observado, os tratamentos foram

significativos para todas as variáveis avaliadas, com exceção do comprimento total das plântulas.

Tabela 13 – Resultados da ANOVA para as variáveis avaliadas no ensaio de controle biológico *in vivo* em plântulas de *Pinus taeda* L.

FONTES DE VARIAÇÃO	G.L.	Emergência (%)	Plântulas Normais (%)	Plântulas Anormais (%)	Sementes Mortas (%)	Comprimento total de plântulas normais (cm)	Massa seca total (MST) de plântulas normais (g)
		QUADRADO MÉDIO					
Tratamentos	3	694,67**	1.100,00**	861,33**	694,67**	3,4632^{ns}	0,00206**
Erro	12	58,00	108,67	40,67	58,00	1,0939	0,00027
Coeficiente de Variação (%)		16,74	35,34	39,86	13,97	9,03	35,68
Estatística Q	Q	0,5689	0,4049	0,6803	0,5689	0,4310	0,4212

** Significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro ($\alpha \leq 0,01$); * Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro ($0,01 \leq \alpha \leq 0,05$); ^{ns} Não significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O teste de médias indica que a inoculação da suspensão celular dos isolados de forma direta no substrato no momento da semeadura não resultou no controle biológico de *F. proliferatum* inoculado nas sementes (Tabela 14). O tratamento controle sem inoculação do patógeno resultou, como esperado, nos maiores percentuais de plântulas normais (53%), com consequente maior massa seca total produzida (0,079 g). Entretanto, este tratamento não diferiu em termos de percentual de emergência de plântulas e sementes mortas do tratamento controle com inoculação do patógeno; o que confirma a patogenicidade do isolado de *F. proliferatum* sobre as plântulas de *P. taeda* e seu efeito de *damping-off* sobre as mesmas é o percentual estatisticamente maior de plântulas anormais (mortas, com anomalias na parte aérea ou radicular e/ou com presença de estruturas fúngicas) observado (35%) em relação ao tratamento controle sem inoculação do patógeno; ou seja, do total de plântulas emergidas (60%), mais da metade são plântulas anormais que morreram, ou estavam em vias de, em função do *damping-off* pós-emergencial causado pelo patógeno.

Tabela 14 - Resultado do teste de médias de Tukey para as variáveis avaliadas no ensaio de controle biológico *in vivo* em plântulas de *Pinus taeda* L.

Tratamento	Emergência (%)	Plântulas Normais (%)	Plântulas Anormais (%)	Sementes Mortas (%)	Massa seca total (MST) de plântulas normais (g)
T_0	53 a	53 a	0 c	47 b	0,0790 a
T_{0in}	60 a	25 b	35 a	40 b	0,0432 b
T_1	32 b	14 b	18 b	68 a	0,0275 b
T_2	37 b	26 b	11 bc	63 a	0,0358 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si ao nível de probabilidade de erro de 5%.
Tratamentos: T_0 – Tratamento controle: sementes desinfestadas sem inoculação do patógeno, substrato sem inoculação dos antagonistas; T_{0in} – Tratamento controle inoculado: sementes desinfestadas com inoculação do patógeno por 48 h, substrato sem inoculação dos antagonistas; T1 – Sementes desinfestadas com inoculação do patógeno por 48 h, substrato com inoculação do antagonista I14R; T2 – Sementes desinfestadas com inoculação do patógeno por 48 h, substrato com inoculação do antagonista I51.

Quanto ao número de plântulas normais e produção em massa seca das mesmas, o tratamento controle com inoculação do patógeno não diferiu dos tratamentos com os antagonistas, sendo ambos estatisticamente inferiores ao observado no tratamento controle sem inoculação do patógeno.

O insucesso do controle observado no ensaio *in vivo* pode ser atribuído à forma de inoculação dos antagonistas e mesmo do patógeno não ter favorecido a interação entre estes. Moraga-Suazo et al. (2011) avaliaram o potencial de 18 isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *F. circinatum*, fungo causador de cancro de haste em coníferas. Utilizando mudas de *P. radiata*, testou-se a habilidade dos isolados em reduzir a mortalidade pós-emergência, elevando assim a sobrevivência das mudas. A inoculação dos antagonistas e do patógeno foi feita de forma direta no substrato por meio de suspensão celular dos isolados. Num primeiro ensaio os autores fizeram a inoculação dos antagonistas sete dias antes de inocularem o patógeno; no segundo ensaio, o patógeno foi inoculado 48 h antes dos antagonistas; e ambos os ensaios contaram com dois tratamentos controle: um com a inoculação apenas do patógeno e outro sem inoculação alguma. Os resultados observados pelos autores podem explicar a não-efetividade observada no presente trabalho, uma vez que os experimentos mostraram que não houve controle da ocorrência da doença quando os antagonistas foram inoculados após o patógeno, mas sim quando foram inoculados antes do patógeno, reduzindo a mortalidade pós-emergencial das plântulas. Isso indica que há a necessidade de estabelecimento prévio do *Trichoderma* spp. no substrato para que este possa expressar o potencial de biocontrolador.

Por outro lado, em controle de doenças de parte aérea, a inoculação via suspensão celular de espécies de *Trichoderma* em órgãos já infectados pode apresentar efetividade. Bomfim (2007) avaliou a potencialidade antagônica de isolados de *Trichoderma viride*, *T. virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster), *T. harzianum* e *T. stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth. a *R. stolonifer*, patógeno causador de podridão mole ou floral em maracujazeiro, inoculando via pulverização de suspensão celular dos antagonistas na concentração de 2 x 10^8 conídios.mL^{-1}, em flores já infectadas pelo fitopatógeno. Observou-se que para este patossistema e forma de inoculação dos antagonistas houve um controle eficiente do patógeno por todas as quatro espécies de *Trichoderma* avaliadas, elevando o número médio de frutos efetivos de 42% observado na testemunha para mais de 74% nos tratamentos que receberam os antagonistas.

Outra forma de inoculação no substrato que pode ser mais efetiva no controle de *Fusarium* spp. por *Trichoderma* spp. é a microbiolização das sementes. Carvalho et al. (2011) avaliaram seis isolados de *T. harzianum* no controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* J.B. Kendr. & W.C. Snyder em sementes, bem como seu efeito no crescimento inicial do feijoeiro comum (*P. vulgaris*). Para o ensaio, os autores utlizaram sementes sadias e artificialmente infectadas pelo patógeno que foram microbiolizadas com 2 mL de suspensões dos antagonistas (2,5 x 10^8 conídios.mL^{-1}) para cada 100 g de sementes, em rolo de papel germtest a 20 e 25°C. Em casa de vegetação, os isolados foram aplicados em concentrações iguais a 5 x 10^9 conídios a cada 500 g de substrato autoclavado, com avaliação do comprimento das raízes e parte aérea das plantas 11 dias após o semeio. Todos os isolados de *T. harzianum* apresentaram antagonismo *in vitro* contra o patógeno. Contudo, os testes *in vivo* diferiram, em que quatro dos isolados foram estatisticamente superiores à testemunha, reduzindo a incidência do patógeno entre 35 e 51% além de uma proporção entre 73 e 81% de plântulas normais. Contrariamente, para *P. elliottii*, Maciel *et al.* (2014) observaram que, apesar da ação antagonista de *Trichoderma* spp. a *F. sambucinum in vitro*, a microbiolização das sementes, tanto por contato direto entre semente e cultura em placa quanto por peliculização dos agentes antagonistas não resultou no controle biológico do patógeno.

Em *P. echinata*, a inoculação massal no substrato de *T. harzianum* em forma de grânulos resultou numa redução na incidência de *damping-off* (KELLEY et al., 1976), contudo apenas em condição de solo autoclavado. Em mudas já estabelecidas no substrato, a inoculação direta via cultura em arroz, demonstrou ser efetiva para controle biológico de *Xanthomonas euvesicatoria* Jones et al. e *Alternaria solani* (Ellis & G.

Martin), em *Solanum lycopersicum* L. (tomateiro) (FONTANELLE et al., 2011) muito embora os patógenos tenham sido inoculados no mínimo após 72 h da inoculação dos antagonistas. Isto indica que para viabilizar o controle biológico é necessário o prévio estabelecimento dos fungos antagonistas no substrato antes da semeadura das sementes infestadas com o patogeno. Além disso, o uso de meios físicos como a cultura em arroz, para inoculação do antagonista pode favorecer o sucesso do biocontrole, dada a maior facilidade de *Trichoderma* spp. colonizar o restante do substrato a partir de estruturas fúngicas já estabelecidas no meio de cultura do que a partir dos conídios, que ainda podem ser lixiviados na irrigação.

Somado ao já exposto, há que se considerar que enzimas e antibióticos produzidos por *Trichoderma* spp. que aparentemente estão envolvidas no biocontrole de patógenos de plantas tem sua produção fortemente influenciada pelo meio de cultura e condições ambientais utilizado em laboratório nos testes *in vitro*, o que não ocorre na natureza (HOWELL, 2003) ou mesmo em condições de viveiro, dada as variações de temperatura, umidade, luminosidade e mesmo a presença de outros microrganismos no substrato, por exemplo. Também deve-se considerar que, devido à dificuldade de se erradicar fungos que sobrevivem internamente à semente, como *Fusarium* spp., a alternativa mais promissora para o seu controle ainda é eliminar ou a reduzir o inóculo no ambiente, em especial nas sementes e nos restos culturais (MACIEL et al., 2014).

5. CONCLUSÕES

O isolados I14R (*Trichoderma* sp.) e I51 (*T. asperellum*) apresentam potencial de biocontrole de *F. proliferatum in vitro*;

Com inoculação direta da suspensão celular dos isolados I14R e I51 não houve biocontrole *in vivo* de *F. proliferatum* inoculado nas sementes de *P. taeda*;

A inoculação direta da suspensão celular dos isolados I14R e I51 não é um método eficiente para controle biológico de *F. proliferatum* em sementes de *P. taeda*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS, R.M.; BARTHA, R. **Microbial ecology:** fundamentals and applications. 4ª Ed. Menlo Park, Califórnia: Benjamin Cummings Science Publishing, 1998. 694 p.

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.

BERG, G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 11-18, 2009.

BOMFIM, M.P. **Antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo.** Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. UESB, Vitória da Conquista, 2007. 74 f.

BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews,** v. 79, p. 473-495, 2004.

CARVALHO, D.D.C.; MELLO, S.C.M.; LOBO JÚNIOR, M.; SILVA, M.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 1, p. 28-34, 2011

FONTANELLE, A.D.B.; GUZZO, S.D.; LUCON, C.M.M.; HARAKAVA, R. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. **Crop Protection**, v. 30, p. 1492-1500, 2011.

FORTES, F.O.; SILVA, A.C.F.; ALMANÇA, M.A.K.; TEDESCO, S.B. Promoção de enraizamento de microestacas de um clone de *Eucalyptus* sp. por *Trichoderma* spp. **Revista Árvore,** v. 31, n. 22, p. 221-228, 2007.

FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. (Editoras). **Microbiota do solo e qualidade ambiental.** Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; ISHIDA, A.K.N.; SCHURT, D.A. Bactérias de filoplano de maracujazeiro como agentes de controle biológico da mancha-bacteriana. In: **Fórum De Apresentação De Resultados De Pesquisas: Avanços E Oportunidades**, 2014, Jaguariúna. [Anais]. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2014. Disponível em < http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1002458/1/RE011.pdf> Acesso em 10 out 2015.

HARMAN, G. E.; HOWELL, C. R.; VITERBO, A,; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology,** v.2, n. 1, p.43-56, 2004.

HARMAN, G.E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. **Phytopathology**, v. 96, n. 2, p. 190-194, 2006.

HOHMANN, P.; JONES, E.E.; HILL, R.A.; STEWART, A. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonisation and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**, v. 115, p. 759-767, 2011.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1, p. 5-10, 2003.

KELLEY, W.D. Evaluation of *Trichoderma harzianum*-impegnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamomic* causing damping-off of pine seedlings. **Phytopathology**, v. 66, p. 1023-1027, 1976.

LAZAROTTO, M.; BOVOLINI, M.P.; MACIEL, C.G.; MUNIZ, M.F.B. Seleção *in vitro* de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial de antagonismo a isolados patogênicos de *Fusarium* spp. In: Simpósio de Ensino, Pesquisa e Extensão – SEPE, XVI, **Anais...**, v. 3, 2012.

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

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

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

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Brasil. **Regras para análise de sementes.** Brasília : Mapa/ACS, 2009. 399 p.

MATOS, K.S.; CARVALHO, I.F.; ARAÚJO, D.V.; SILVA, M.L.; FARIAS, T.N. Estudo *in vitro* da potencialidade de *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Fusarium guttiforme*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 19, p. 2234-2243, 2014.

MARX, D.H. Growth of ectomycorrhizal and nonmycorrhizal shortleaf pine seedlings in soil with *Phytophthora infestans*. **Phytopathology**, v. 63, p. 18-23, 1973.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of Pine roots to pathogenic infections. V. Resistance of mycorrhizae to infection by vegetative mycelium of *Phytophthora cinnamomi*. **Phytopathology**, v. 60, p. 1472-1473, 1970.

MENDES, M.A.S.; SILVA, V.L.; DIANESE, J.C. et al. **Fungos em plantas no Brasil.** Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. 569 p.

MORAGA-SUAZO, P.; OPAZO, A.; ZALDÚA, S.; GONZÁLEZ, G.; SANFUENTES, E. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 71, n. 3, p. 412-417, 2011.

MORETTO, K. C. K.; GIMENES-FERNANDES, N.; SANTOS, J. M. dos. Influence of *Trichoderma* spp. on *Colletotrichum acutatum* mycelial growth and morphology and on infection of 'Tahiti' lime detached flowers. **Summa Phytopathologica**, v.27, n.4, p. 357-364, 2001.

MILANESI, P.M. **Caracterização, toxicidade e patogenicidade de *Fusarium* spp. em genótipos de soja em sistema plantio direto**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

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

REGLÍNSKI, T.; RODENBURG, N.; TAYLOR, J.T.; NORTHCOTT, G.L.; AH CHEE, A.; SPIERS, T.M.; HILL, R.A. *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic resistance to *Diplodia pinea* in radiata pine (*Pinus radiata*) seedlings. **Forest Pathology**, v. 42, p. 75-78, 2012.

REIS, M.R. LEÃO, E.U.; SANTOS, G.R.; SARMENTO-BRUM, R.B.C; GONÇALVES, C.G.; CARDON, C.H.; SILVA, D.B. Impacto de herbicidas em isolados de *Trichoderma* spp. **Planta Daninha,** v. 31, n. 2, p. 419-426, 2013.

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

SILVA, F.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, G.C.; GOMES, D.P.; KRONKA, A.Z.; MORAES, M.H. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) provenientes do estado de Goiás. **Semina Ciências** Agrárias, v. 29, p. 29-34, 2008.