

ANTAGONISMO DE *Trichoderma* SPP. E *Bacillus subtilis* (UFV3918) A *Fusarium sambucinum* EM *Pinus elliottii* ENGELM¹

Caciara Gonzatto Maciel², Clair Walker², Marlove Fátima Brião Muniz³ e Maristela Machado Araújo⁴

RESUMO – *Pinus elliottii* é uma espécie de importância no setor florestal e apresenta vulnerabilidade na qualidade sanitária de suas sementes, especialmente pela associação de *Fusarium* spp., responsável por perdas de plântulas no viveiro. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antagonista *in vitro* e *in vivo* dos agentes *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) no controle de *Fusarium sambucinum*, responsável por danos em plântulas de *Pinus elliottii*. O controle *in vitro* foi avaliado através da inibição do crescimento micelial (confronto pareado de culturas), após a incubação a 25±2 °C e fotoperíodo de 12 h. Para os testes *in vivo* (desenvolvidos em condições de viveiro), as sementes inicialmente foram inoculadas com o patógeno e, na sequência, microbiolizadas com os agentes antagonísticos, para posterior semeadura. Utilizaram-se as técnicas de contato com o biocontrolador em meio BDA por 48 h e peliculização, como formas de microbiolização. Tanto *Trichoderma* spp. quanto *Bacillus subtilis* (UFV3918) foram eficientes no controle *in vitro* de *F. sambucinum*, e no teste de biocontrole *in vivo* o produto *Bacillus subtilis* (UFV3918) destacou-se, reduzindo as perdas de plântulas causadas pelo patógeno, assim como potencializando as variáveis de comprimento de plântula, massa verde e massa seca.

Palavras-chave: Biocontrole; Microbiolização; Promoção de crescimento.

ANTAGONISM OF *Trichoderma* SPP. AND *Bacillus subtilis* (UFV3918) TO *Fusarium sambucinum* IN *Pinus elliottii* ENGELM

ABSTRACT – *Pinus elliottii* is an important species in the forest sector, which has restrictions such as seed sanitary quality, especially the association of *Fusarium* spp., responsible for seedling losses in the nursery. This study evaluated antagonist *in vitro* and *in vivo* action of *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* (UFV3918) in controlling *Fusarium sambucinum*, responsible for damage in *Pinus elliottii* seedlings. The *in vitro* assay considered the inhibition of mycelial growth (paired comparison of cultures) after incubation at 25 ± 2 °C and photoperiod of 12 hours. For *in vivo* tests (performed in nursery conditions) seeds were initially inoculated with the pathogen and, subsequently, microbiolized with antagonistic agents, before sowing. The techniques of contact with biocontroller on PDA for 48 hours and seed coating, as forms of microbiolization, were used. Both *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* (UFV3918) were efficient on the *in vitro* control of *F. sambucinum*; however, *Bacillus subtilis* (UFV3918) was more effective against the pathogen on the *in vivo* biocontrol test, reducing seedlings losses caused by the pathogen and increasing values of length, as well as fresh and dry matter of the seedling.

Keywords: Biocontrol; Microbiolization; Growth promotion.

¹ Recebido em 16.06.2013 aceito para publicação em 13.03.2014.

² Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: <caciaraconzatto@gmail.com> e <clairwalker@gmail.com>.

³ Departamento de Defesa Fitossanitária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: <marlovemuniz@yahoo.com.br>.

⁴ Departamento de Ciências Florestais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: <araujo.maristela@gmail.com>.

1. INTRODUÇÃO

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

O tratamento de sementes florestais, embora pouco estudado, é ferramenta fundamental para diminuir a incidência de doenças na fase de emergência, podendo contribuir para a redução ou a erradicação desse problema. Devido às restrições com o uso de fungicidas e aos cuidados necessários com o meio ambiente, o uso do tratamento biológico vem ganhando destaque. Porém, ainda são necessários estudos para viabilizar as técnicas de aplicação e os microrganismos com potencial para esse fim. Nesse sentido, a microbiolização de sementes aparece como técnica promissora e tem apresentado resultados no controle de patógenos associados às sementes (LUDWIG, 2009).

Diante do exposto, neste trabalho, objetivou-se avaliar a ação antagonista *in vitro* e *in vivo* dos agentes *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) no controle de *F. sambucinum*, responsável por danos em plântulas de *Pinus elliottii*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismos e sementes

As sementes de *Pinus elliottii* (LOTE, 2009) utilizadas neste estudo foram adquiridas na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – Fepagro Florestas – Estação Experimental Boca do Monte, localizada no Município de Santa Maria, RS. Foi utilizado um isolado de *Fusarium sambucinum* obtido de sementes de *Pinus elliottii*, patogênico para plântulas dessa espécie, causando tombamento e diminuição de peso fresco e seco de plântulas (MACIEL et al., 2013).

Foram testados dois produtos comerciais: Agrotlich Plus®, à base do fungo *Trichoderma* spp. e Rizolyptus®, à base da bactéria *Bacillus subtilis* (UFV3918). Os agentes

biológicos foram transferidos em pequenas quantidades para placas de Petri com meio de cultura batata (200 g) – dextrose (20 g) – ágar (20 g) (BDA), em que os microrganismos, antes de serem utilizados, cresceram por sete dias para *Trichoderma* spp. e 48 h para *B. subtilis*.

2.2. Ação dos biocontroladores *in vitro*

A ação antagonista de *Trichoderma* spp. e *B. subtilis* (UFV3918) sobre *Fusarium sambucinum* foi avaliada através do teste de confrontação direta. Para tanto, foram organizadas as seguintes combinações:

Trichoderma spp. x *Fusarium sambucinum*: um cilindro de meio de cultura BDA de 8 mm de diâmetro contendo micélio de *F. sambucinum* de sete dias, foi transferido para placas de Petri (90 mm de diâmetro) também contendo meio BDA, a aproximadamente 5 mm da borda da placa. Esse material foi incubado durante 48 h a 25±2 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, um disco de meio de cultura BDA, com 8 mm de diâmetro, contendo micélio de *Trichoderma* spp. foi transferido para a posição oposta ao disco de micélio de *F. sambucinum* nas placas de Petri. As placas foram incubadas durante sete dias a 25±2 °C, com fotoperíodo de 12 h. As placas-controle foram compostas apenas por *Trichoderma* spp. e apenas por *F. sambucinum*. Foram feitas medidas de crescimento do diâmetro da colônia do patógeno, diariamente, com o auxílio de um paquímetro digital. E, aos sete dias, as placas receberam uma nota, de acordo com a escala proposta por Bell et al. (1982).

Bacillus subtilis (UFV3918) x *Fusarium sambucinum*: um cilindro de meio de cultura BDA de 8 mm de diâmetro, contendo micélio de *F. sambucinum*, foi transferido para o centro da placa de Petri (90 mm de diâmetro), também contendo meio BDA. Esse material foi incubado durante 48 h a 25±2 °C, com fotoperíodo de 12 h. Após esse período, quatro gotas de 0,5 mL contendo células bacterianas de *B. subtilis* (UFV3918) foram dispostas equidistantes entre si e do centro da placa de Petri, uma gota em cada quadrante. As placas foram mantidas em incubadora, nas mesmas condições. As avaliações foram baseadas em medidas diárias do crescimento do diâmetro da colônia do patógeno, com o auxílio de um paquímetro digital, e verificação da formação de halo de inibição, metodologia adaptada de Sottero et al. (2006).

A partir dos dados de crescimento micelial (mm), calculou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial, segundo Menten et al. (1976), com a fórmula: $\% \text{ inibição} = [(crtest - crtrat) / crtest] \times 100$, em que crtest = crescimento radial da testemunha; e crtrat = crescimento radial do tratamento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três tratamentos e cinco repetições, em que cada repetição é composta por uma placa de Petri. Inicialmente, foi verificado se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, utilizando o Programa BioEstat 5.0. Os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{x + 0,5}$, para a análise da variância.

Os resultados em unidades decimais não sofreram transformações. A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, e para os dados de crescimento micelial (mm dia⁻¹) foi realizada uma análise de regressão em função do tempo em dias, utilizando-se o software SISVAR 5.3.

2.3. Ação dos biocontroladores *in vivo*

Os tratamentos do teste *in vivo* estão apresentados na Tabela 1. As sementes utilizadas nos testes permaneceram armazenadas no freezer (3-5 °C) por duas semanas até a sua utilização, como método de superação da dormência (BRASIL, 2009). Antes da aplicação das técnicas, as sementes passaram por uma assepsia superficial. Utilizou-se uma solução de álcool 70% (v v⁻¹) por 30 seg, em seguida hipoclorito de sódio

1% (v v⁻¹) por 1 min e, na sequência, três banhos em água destilada e esterilizada e, então, foram deixadas secar sobre papel-filtro esterilizado.

Após a aplicação dos tratamentos, fez-se a semeadura de uma semente por tubete. Foram utilizadas 100 sementes para cada tratamento, divididas em quatro repetições de 25, colocadas em tubetes de 50 cm³ com o substrato comercial (previamente esterilizado em autoclave [120 °C e 1 atm] por dois tempos de 60 min, com intervalo de 24 h). O material foi mantido em casa de vegetação com temperatura média entre 22 e 26 °C e com irrigação diária através de uma barra móvel de microaspersores com lâmina d'água de 5 mm.

As avaliações foram: **a) sintomas de *F. sambucinum***: semanais (até os 42 dias), na última avaliação, as plântulas tombadas foram quantificadas; **b) sementes não germinadas**: compreendem as sementes mortas e, ou, duras, que não deram início ao processo germinativo; e **c) emergência**: semanais (até os 42 dias), computando-se o número de plântulas emergidas. Para os itens **a**, **b** e **c**, os resultados foram expressos em porcentagem. Na última contagem de emergência (42 dias), realizaram-se as seguintes avaliações: **d) comprimento da parte aérea, radicular e comprimento total**: mediram-se 10 plântulas por repetição. Estas foram medidas com o auxílio de régua graduada; **e) massa verde de plântulas**: todas as plântulas de cada repetição foram pesadas em balança analítica de precisão 0,01 g.; e **f) massa seca de plântulas**: para a determinação da massa seca, as plântulas utilizadas na determinação

Tabela 1 – Tratamentos do teste de biocontrole *in vivo* com os agentes *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) sobre *Fusarium sambucinum*.

Table 1 – Treatments of biocontrol test *in vivo* with agents *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* (UFV3918) on *Fusarium sambucinum*.

| Tratamentos | Método de inoculação do patógeno | X | Método de inoculação dos biocontroladores |
|-------------|--------------------------------------------------|---|-----------------------------------------------------|
| T 1 | Contato ¹ + <i>Fusarium</i> sp. | X | - |
| T 2 | Contato ¹ + <i>Fusarium</i> sp. | X | Contato ¹ + <i>B. subtilis</i> (UFV3918) |
| T 3 | Contato ¹ + <i>Fusarium</i> sp. | X | Direta ³ <i>B. subtilis</i> (UFV3918) |
| T 4 | Contato ¹ + <i>Fusarium</i> sp. | X | Direta ³ Agrotich Plus [®] |
| T 5 | Peliculização ² + <i>Fusarium</i> sp. | X | - |
| T 6 | Peliculização ² + <i>Fusarium</i> sp. | X | Contato ¹ + <i>B. subtilis</i> (UFV3918) |
| T 7 | Peliculização ² + <i>Fusarium</i> sp. | X | Direta ³ <i>B. subtilis</i> (UFV3918) |
| T 8 | Peliculização ² + <i>Fusarium</i> sp. | X | Direta ³ <i>Trichoderma</i> spp. |
| Testemunha | - | X | - |

¹ Contato com a cultura pura do patógeno ou do antagonista em meio BDA por 48 hs, a 25 °C e fotoperíodo de 12 hs; ² Aplicação do polímero Polyseed[®] (1ml de produto : 1ml de água) para cada 100 sementes de *P. elliottii*; permanência por 24 hs e posterior banho em suspensão de *F. sambucinum* (10⁶ esporos ml⁻¹); ³ Contato das sementes direto com o produto (1 ml de Rizolyptus[®] ou 1 g de Agrotich Plus[®] para cada 100 sementes de *P. elliottii*).

da massa verde foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas em estufa a 60 ± 3 °C até atingirem massa constante.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado, com quatro repetições para cada teste realizado. Inicialmente, verificou-se se os dados apresentavam distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk, no Programa BioEstat 5.0. Para a análise da variância, os dados que não seguiram a distribuição normal foram transformados segundo $\sqrt{x + 0,5}$.

Os resultados em unidades decimais não sofreram transformações. A comparação das médias foi feita pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com o *software* SISVAR 5.3.

3. RESULTADOS

3.1. Ação dos biocontroladores *in vitro* sobre *Fusarium sambucinum*

Trichoderma spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) apresentaram ação antagonista sobre o patógeno *F. sambucinum*, entretanto essa ação foi mais pronunciada quando se utilizou o agente *Trichoderma* spp., o qual inibiu em mais de 60% o crescimento da colônia, como apresentado na Tabela 2.

Pela curva e equação de regressão (Figura 1), observa-se uma tendência linear para o crescimento do patógeno (testemunha), enquanto nos tratamentos de confronto direto as variáveis adequaram-se a uma quadrática.

Durante o confronto *Trichoderma* spp. x *Fusarium sambucinum*, o crescimento do patógeno foi permitido até 24 h de incubação; nas 24 h seguintes, *Trichoderma* spp. reduziu a área colonizada pelo patógeno, multiplicando-se sobre ele. No caso do *Bacillus subtilis*, observou-se reação diferente, na qual o patógeno cresceu até as primeiras 48 h, com média aproximada

Tabela 2 – Crescimento e porcentagem de inibição do crescimento micelial de *Fusarium sambucinum* em cultivo pareado com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* *in vitro*, após cinco dias de incubação (25 ± 2 °C - fotoperíodo de 12 h).

Table 2 – Growth and inhibition percentage of mycelial growth of *Fusarium sambucinum* in paired culture with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* *in vitro*, five days after the incubation (25 ± 2 °C - photoperiod of 12 h).

| Treatments | Mycelial growth (cm) | % inhibition |
|-----------------------------------------------------------|----------------------|--------------|
| <i>F. sambucinum</i> x <i>Trichoderma</i> spp. | 2,21 a* | 62,9 a |
| <i>F. sambucinum</i> x <i>Bacillus subtilis</i> (UFV3918) | 4,93 b | 18,76 b |
| <i>F. sambucinum</i> | 6,12 b | 0,0 b |
| C.V. (%) | 16,29 | 45,72 |

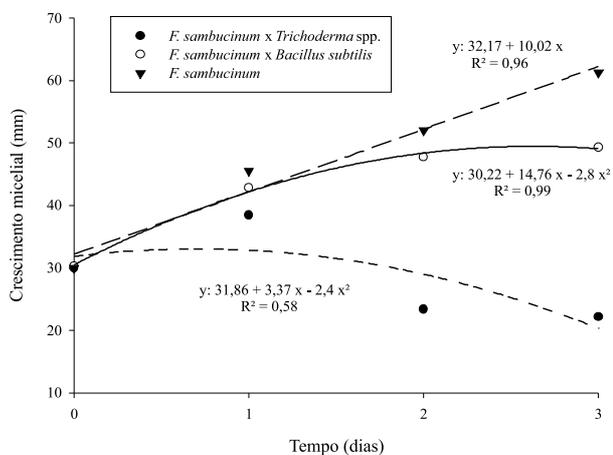


Figura 1 – Curva e equação de regressão do cultivo pareado de *Fusarium sambucinum* com *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918), em diferentes tempos de incubação.

Figure 1 – Curve and regression equation of *Fusarium sambucinum* paired with *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* (UFV3918) at different incubation times.

com a da testemunha. Entretanto, quando as estruturas do patógeno se aproximaram do antagonista (72 h), verificou-se interrupção no crescimento do patógeno, evidenciada pela formação do halo de inibição entre o patógeno e o antagonista.

3.2. Ação dos biocontroladores *in vivo* sobre *Fusarium sambucinum*

Na Tabela 3, verifica-se que os tratamentos que se destacaram aos sete dias foram aqueles cuja inoculação foi via contato, independentemente da presença do fungo ou não. A água presente no meio BDA atua como agente estimulador, promovendo o amolecimento do tegumento, facilitando a penetração do oxigênio e aumentando o volume do embrião, estimulando, assim, as atividades metabólicas básicas (MARCOS FILHO, 1986) e favorecendo a emergência.

Tabela 3 – Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de *Pinus elliottii*, através das variáveis: emergência aos sete (E7), emergência aos 21 (E21) e emergência aos 42 dias (E42), plântulas tombadas (PT) e sementes não germinadas (SNG).

Table 3 – Effect of biocontrol in the final quality of seedlings of *Pinus elliottii*, through the variables: Emergence after seven days (E7), emergence after 21 days (E21) and emergence after 42 days (E42), damping-off (PT) and non germinated seeds (SNG).

| Tratamentos | Variáveis (%) | | | | |
|------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------|-------|-------|----------|
| | E7 | E21 | E42 | PT | SNG |
| T1 - Contato + <i>F. sambucinum</i> | 4,0 bc* | 28 bc | 51 ab | 6,0 a | 43 abc |
| T2 - Contato + <i>F. sambucinum</i> x Contato + <i>B. subtilis</i> (UFV3918) | 20 a | 55 a | 67 a | 8,0 a | 25 c |
| T3 - Contato + <i>F. sambucinum</i> x <i>B. subtilis</i> (UFV3918) | 4,0 bc | 15 bc | 44 ab | 4,0 a | 52 abc |
| T4 - Contato + <i>F. sambucinum</i> x <i>Trichoderma</i> spp. | 11 b | 31 abc | 57 ab | 3,0 a | 40 abc |
| T5 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> x Contato+ <i>Trichoderma</i> spp. | 11 b | 32 abc | 54 ab | 2,0 a | 44 abc |
| T6 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> x <i>B. subtilis</i> (UFV3918) | 0,0 c | 11 bc | 36 bc | 6,0 a | 58 ab |
| T7 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> x <i>Trichoderma</i> spp. | 0,0 c | 36 ab | 66 a | 1,0 a | 33 bc |
| T8 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> | 0,0 c | 8,0 c | 34 c | 1,0 a | 65 a |
| T9 - Peliculização | 0,0 c | 19 bc | 40 bc | 0,0 a | 60 ab |
| T10 - Contato com meio BDA | 9,5 b | 35,5 ab | 64 ab | 0,0 a | 36 bc |
| Testemunha | 1,0 c | 29 abc | 57 ab | 5,0 a | 26,7 abc |
| C.V(%) | 53,6 | 40,9 | 19,99 | 32,12 | 25,79 |

Os resultados obtidos aos 21 dias apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. O confronto *in vivo* do patógeno *F. sambucinum* com a bactéria antagonista *B. subtilis* (UFV3918) destacou-se entre os demais, apresentando um percentual de germinação que diferiu do da testemunha (sem tratamento) e foi superior à maioria dos outros tratamentos (Tabela 3). A forma de inoculação via contato pode ter facilitado essa ação, já que a semente permaneceu mais tempo em contato com ambos os microrganismos, se comparada com a inoculação via peliculização.

A contagem final deu-se aos 42 dias após a instalação dos testes, quando foram verificados tombamento nas mudas e, também, desprendimento do substrato nos tratamentos em que ocorreu inoculação do patógeno *F. sambucinum*. Essas plântulas não desenvolveram raízes secundárias, comuns no sistema radicular de uma plântula normal, e, dessa forma, ficaram mais suscetíveis às ações da irrigação.

Ainda na Tabela 3, as sementes tratadas com o agente *Trichoderma* spp. apresentaram percentual de emergência, aos 42 dias, estatisticamente igual ao da testemunha, mesmo nos casos em que o patógeno *F. sambucinum* foi inoculado. Após a incubação em câmara úmida das plântulas retiradas do viveiro, foi possível observar a associação do antagonista *Trichoderma* spp. com o sistema radicular delas.

Para o comprimento da parte aérea, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, o comprimento da parte radicular variou de 7,94 cm até 11,78 cm, para a testemunha e sementes inoculadas com *F. sambucinum* e tratadas com *B. subtilis* (UFV3918), respectivamente (Tabela 4). Esse último tratamento destacou-se também para o comprimento total de plântulas e massa verde e seca, sendo superior a todos os demais.

4. DISCUSSÃO

Verificou-se que o crescimento de *F. sambucinum* foi inferior quando confrontado com *Trichoderma* spp. (2,21 cm) (Tabela 2). Bonfim et al. (2010) destacaram uma rápida ação antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Rhizopus stolonifer*, com inibição do crescimento micelial do patógeno em apenas 72 h de confronto. De acordo com esses autores, a redução do crescimento da colônia do fitopatógeno, na presença de *Trichoderma* spp., pode estar vinculada à liberação de metabólitos pelo antagonista. Neste estudo, não foi observada a formação de halo de inibição para o confronto com *Trichoderma* spp., entretanto se constatou uma competição entre os microrganismos por substrato, em que o antagonista foi favorecido pelo seu crescimento mais rápido.

A ação antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium sambucinum*, conforme a escala de Bell et al. (1982), recebeu nota 2, que constitui a ocupação de 2/

Tabela 4 – Efeito do biocontrole na qualidade final de mudas de *Pinus elliottii*, através das variáveis: comprimento da parte aérea (PA), comprimento da parte radicular (PR), comprimento total (CT), massa verde (MV) e massa seca (MS).
Table 4 – Effect of biocontrol in the final quality of seedlings of *Pinus elliottii*, through the variables: shoot length (PA), root length (PR), total length (CT), fresh matter (MV) and dry matter (MS).

| Tratamentos | Variáveis | | | | |
|-------------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------|-----------|------------|---------|
| | PA | PR | CT | MV | MS |
| | cm/plântula | | | g/plântula | |
| T1 - Contato + <i>F. sambucinum</i> | 7,32 a* | 10,62 ab | 17,95 a | 2,94 bc | 0,42 bc |
| T2 - Contato + <i>F. sambucinum</i> x Contato + <i>B. subtilis</i> (UFV3918) | 7,27 a | 11,78 a | 19,05 a | 4,66 a | 0,67 a |
| T3 - Contato + <i>F. sambucinum</i> x <i>B. subtilis</i> (UFV3918) | 7,11 a | 10 bc | 17,1 abc | 2,65 cd | 0,37 c |
| T4 - Contato + <i>F. sambucinum</i> x <i>Trichoderma</i> spp. | 7,36 a | 10,19 abc | 17,55 ab | 3,22 bc | 0,46 bc |
| T5 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> x Contato + <i>Trichoderma</i> spp. | 7,35 a | 9,65 bcd | 17 abc | 3,03 bc | 0,47 b |
| T6 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> x <i>Rizolyptus</i> ® | 6,75 a | 8,77 bcd | 15,52 bc | 1,54 ef | 0,25 de |
| T7 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> x <i>Trichoderma</i> spp. | 6,9 a | 10,51 abc | 17,41 ab | 3,42 b | 0,51 b |
| T8 - Peliculização + <i>F. sambucinum</i> | 7,27 a | 7,94 cde | 14,93 b | 2,21 d | 0,26 d |
| T9 - Peliculização | 4,60 b | 6,8 e | 11,42 d | 1,39 f | 0,16 e |
| T10 - Contato com meio BDA | 4,94 b | 7,31 de | 12,27 d | 2,14 de | 0,21 cd |
| Testemunha | 6,99 a | 9,48 bcd | 16,75 abc | 2,98 bc | 0,41 ab |
| C.V. (%) | 7,03 | 7,66 | 6,03 | 6,15 | 9,33 |

3 da placa pelo antagonista aos sete dias (Figura 2B). Outros trabalhos já registraram a eficiência da ação antagonista do gênero *Trichoderma* spp. sobre *Fusarium* sp. (CARVALHO et al., 2008; MORSY et al., 2009; CARVALHO et al., 2011; MORADI et al., 2012; RU; DI, 2012).

O mecanismo de ação da bactéria *B. subtilis* (UFV3918) diferiu do apresentado pelo fungo *Trichoderma* spp. O gênero *Trichoderma* apresenta crescimento rápido, disputando área com o patógeno, enquanto segundo Asaka e Shoda (1996) a eficiência na atividade *in vitro* apresentada por *B. subtilis* está associada à capacidade que essa bactéria tem em produzir antibióticos como *iturina A* e *sufactina*, capazes de atuar na inibição do crescimento micelial de fungos. O uso de *Bacillus subtilis* foi eficiente para o controle de *F. oxysporum* em *Cicer arietinum* L. (grão-de-bico), *in vivo* (MORADI et al., 2012) e *Fusarium solani* em *Lycopersicon esculentum* L. (tomate), *in vitro* e *in vivo* (MORSY et al., 2009).

Devido à complexidade envolvida na erradicação de fungos que sobrevivem internamente à semente, como *Fusarium* sp., a alternativa mais promissora para o seu controle é a eliminação ou a redução do inóculo, em especial nas sementes e nos restos culturais. A habilidade desenvolvida por *Trichoderma* spp. na promoção do crescimento de plantas está relacionada,

entre outros fatores, à sua capacidade de associação simbiótica com raízes das plantas (HARMAN et al., 2004; SANTOS, 2008). Maciel et al. (2012) relataram ação *in vitro* e *in vivo* do antagonista *Trichoderma* spp. (Trichodel®) sobre o patógeno *Cylindrocladium candelabrum*, causador de danos a *Eucalyptus saligna*.

Hohmann et al. (2011) afirmaram que o uso de *Trichoderma hamatum* LU592 na peliculização de sementes e via pulverização de suspensão de esporos após a semeadura são eficientes no tratamento de sementes de *Pinus radiata*, com vários ganhos associados à qualidade da planta, como comprimento de plântula e massa seca radicular. Esses autores associam esse ganho de crescimento à capacidade do fungo em colonizar a rizosfera das plantas, enquanto para Verma et al. (2007) a simples presença física da massa micelial na rizosfera das plantas aumenta a absorção de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento.

A microbiolização das sementes com *B. subtilis* (UFV3918) conferiu melhores resultados na qualidade final das plantas, em comparação com a testemunha. Outros pesquisadores já observaram efeito benéfico com promoção de crescimento em mudas de *Eucalyptus* spp. produzido por *B. subtilis* (MAFIA et al., 2007; MAFIA et al., 2009), e Luz (2001) registrou aumento no rendimento dos grãos de milho utilizando sementes tratadas com rizobactérias, em especial *B. subtilis*.

5. CONCLUSÕES

- *Bacillus subtilis* (UFV3918) e *Trichoderma* spp. são eficientes no controle *in vitro* de *F. sambucinum*.

- *Bacillus subtilis* (UFV3918) é promissor no biocontrole *in vivo* de *F. sambucinum*, proporcionando maior vigor às plântulas e reduzindo as perdas ocasionadas pelo patógeno.

6. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

7. REFERÊNCIAS

- ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and environmental microbiology**, v.62, n.11, p.4081-4085, 1996.
- 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.
- BONFIM, M. P. et al. Avaliação antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma* spp. a *Rhizopus stolonifer* em maracujazeiro amarelo. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.1, p.61-67, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: 2009. 395p.
- CARNEIRO, J. S. Teste de sanidade em sementes de essências florestais. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. **Patologia de sementes**. Campinas: Abrates/Cargil, 1987. p.386-394.
- CARVALHO, D. D. C. et al. **Isolados de *Trichoderma* sp. antagônicos a *Fusarium oxysporum***. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2008. 5p. (Comunicado Técnico, 178).
- CARVALHO, D. D. C. et al. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* *in vitro* e em sementes, e promoção do crescimento inicial do feijoeiro comum por *Trichoderma harzianum*. **Tropical Plant Pathology**, v.36, n.1, p.28-34, 2011.
- HARMAN, G. E. et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.
- HOHMANN, P. et al. Understanding *Trichoderma* in the root system of *Pinus radiata*: associations between rhizosphere colonization and growth promotion for commercially grown seedlings. **Fungal Biology**, v.115, n.8, p.759-767, 2011.
- LASCA, C. C.; NOGUEIRA, E. M. C.; PITTA, G. P. B. Condições fitossanitárias de sementes de *Pinus elliottii* Engelm. produzidas no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v.4, n.1, p.1-12, 1978.
- LUDWIG, J. et al. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. **Tropical Plant Pathology**, v.34, n.5, p.322-328, 2009.
- LUZ, W. C. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n.1, p.16-20, 2001.
- MACIEL, C. G. et al. *Trichoderma* spp. no biocontrole de *Cylindrocladium candelabrum* em mudas de *Eucalyptus saligna*. **Revista Árvore**, v.36, n.5, p.825-832, 2012.
- MACIEL, C. G. et al. First report of *Fusarium sambucinum* associated on *Pinus elliottii* seeds in Brazil. **Plant Disease**, v.97, n.7, p.995, 2013.
- MAFIA, R. G. et al. Indução do enraizamento e crescimento do eucalipto por rizobactérias: efeito da adição de fonte alimentar e da composição do substrato de enraizamento. **Revista Árvore**, v.31, n.4, p.589-597, 2007.
- MAFIA, R. G. et al. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista Árvore**, v.33, n.1, p.1-9, 2009.

- MARCOS FILHO, J. Germinação de sementes. In: CICERO, S. M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R. (Coord.). **Atualização em produção de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1986. p.11-39.
- MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass) Goid. "in vitro". **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.57-66, 1976.
- MORADI, H. et al. Suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum*. **Plant Omics Journal**, v.5, n.2, p.68-74, 2012.
- MORSY, E. M. et al. Efficiency of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents against *Fusarium solani* on tomato plants. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v.37, n.1, p.47-57, 2009.
- RU, Z.; DI, W. *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil and their antagonism against *Fusarium sambucinum*. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.18, p.4180-4186, 2012.
- SANTOS, H. A. ***Trichoderma* spp. como promotores de crescimento em plantas e como antagonistas a *Fusarium oxysporium***. 2008. 94f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade da Brasília – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 2008.
- SOTTERO A. N. et al. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, n.2, p.225-234, 2006.
- VERMA, M. et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. **Biochemical Engineering Journal**, v.37, n.1, p.1-20, 2007.