

MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O BIOCONTROLE DA
RIZOCTONIOSE DO CAUPI**

RECIFE – PE

2011

MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O BIOCONTROLE DA
RHIZOCTONIOSE DO CAUPI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

RECIFE – PE

2011

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O BIOCONTROLE DA
RIZOCTONIOSE DO CAUPI**

MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA

COMITÊ DE ORIENTAÇÃO:

Prof. Dr. Sami Jorge Michereff (UFRPE) – Orientador

Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE) – Co-orientadora

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima (UFAL) – Co-orientador

RECIFE – PE

2011

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA O BIOCONTROLE DA
RIZOCTONIOSE DO CAUPI**

MARCELO GARCIA DE OLIVEIRA

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em: 25/02/2011

CO-ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano (UFRPE)

EXAMINADORES:

Dr^a. Sayonara Maria Paulino de Assis (MAPA)

Dr. Domingos Eduardo Guimarães Tavares de Andrade (IPA)

Prof^a. Dr^a Elineide Barbosa de Souza (UFRPE)

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Otacília Alves de Oliveira, pela minha educação, pelo meu caráter, pelos ensinamentos éticos, pelo amor, carinho, respeito, por sempre acreditar, incentivar e torcer pelo meu sucesso, mesmo não estando presente;

Ao meu pai, Manoel Garcia de Oliveira (in memorian), por contribuir na minha criação, pelo carinho que será lembrado como as melhores coisas da minha infância;

Aos meus amados irmãos, Maíza Petrônia de Oliveira, Mazildo Garcia de Oliveira, Manoel Garcia de Oliveira Júnior e Manassés Garcia de Oliveira pelo carinho, afeto, respeito e por estarem presentes em todos os bons momentos da minha vida;

Ao meu amigo e ex-orientador Dr. Nelson Dias Suassuna pelos ensinamentos e incentivo na minha jornada acadêmica.

À todos do laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelos momentos que passamos juntos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me dar força para seguir sempre em frente.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, pelo oferecimento do Curso de Mestrado em Fitopatologia.

Ao Professor Dr. Sami Jorge Michereff, pela atenção, disponibilidade e pelo valioso auxílio nas horas mais complicadas, pela confiança, profissionalismo e principalmente pelas experiências compartilhadas.

À Professora Dr^a. Rosa de Lima Ramos Mariano, pelo apoio e ajuda em todos os momentos e pela disponibilização do Laboratório de Fitobacteriologia e seus instrumentos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia (UFRPE), por ter contribuído substancialmente para esta nova etapa da minha formação acadêmica, especialmente aqueles que demonstraram vontade ao transmitir seus conhecimentos.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação, Darcy e Romildo, pelo apoio aos alunos durante todo o curso.

Aos amigos e colegas de mestrado, Jeferson, Amanda, Cristiane e Leilson que além da amizade estiveram sempre dispostos a colaborar com o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia de Doenças de Plantas pela convivência.

A minha mãe, Otacília, irmãos e sobrinhos que são meu porto seguro, pela confiança, incentivo e pela torcida.

Aos amigos Kátia, Christiane Bruce, Ana Paula, Yrlânia, Litervaldo e Clarice pelo companheirismo, pelo apoio nas horas que mais precisei e pela agradável convivência.

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
CAPÍTULO I - Introdução Geral	9
Referências Bibliográficas	17
CAPÍTULO II - Prospecção de rizobactérias para o biocontrole da rizoctoniose do caupi	23
Resumo	24
Abstract	25
Introdução	26
Material e Métodos	28
Resultados e Discussão	33
Referências Bibliográficas	39
CONCLUSÕES GERAIS	47

RESUMO

A rizoctoniose, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*, é uma importante doença do caupi no Nordeste brasileiro. Esta dissertação teve como objetivos efetuar a prospecção de rizobactérias de caupi como agentes de biocontrole da rizoctoniose e avaliar a estabilidade do controle por isolados promissores em relação a diferentes isolados e densidades de inóculo do patógeno, e tipos de solos. Foram efetuadas coletas de plantas de caupi sem sintomas de doenças radiculares em 22 áreas de plantio. Destas plantas, foram obtidos 87 isolados bacterianos do rizoplano, sendo 59 isolados de *Bacillus* spp. e 28 isolados de *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente. Esses isolados foram avaliados quanto à eficácia na redução da severidade da rizoctoniose do caupi em casa de vegetação. Na seleção preliminar, sementes de caupi (cv. IPA-206) foram imersas nas suspensões bacterianas (aproximadamente 10^8 células/mL) preparadas em solução de $MgSO_4$ 0,1M e semeadas em bandejas contendo solo não esterilizado (Camaragibe) previamente infestado com o patógeno (isolado CMM-2656), na densidade de 150 mg de substrato (arroz) colonizado/kg de solo. A avaliação da severidade da doença foi efetuada após 15 dias, utilizando-se escala de notas de 0 a 4, onde 0 = sem sintomas e 4 = sementes não germinadas e/ou plântulas não emergidas. Somente cinco isolados bacterianos (B-05, B-13, B-63, B-65 e B-71), todos do gênero *Bacillus*, propiciaram níveis de redução da severidade da doença superiores a 45% e foram avaliados em relação a cinco isolados (CMM-2651, CMM-2654, CMM-2666, CMM-2675 e CMM-2682) e três densidades de inóculo (200, 250 e 300 mg/kg de solo) de *R. solani*, bem como cinco tipos de solos (Aldeia, Goiana, Itapirema, Pombos e Vitória). Somente o isolado bacteriano B-71 apresentou níveis similares de controle da rizoctoniose induzidos pelos diferentes isolados do patógeno, com redução média de 24,5% nos níveis de severidade. O isolado bacteriano B-65 apresentou os maiores níveis de controle da doença nas três densidades de inóculo de *R. solani*, com média de 22,2%. Ficou evidente a influência do solo na eficácia dos isolados bacterianos. A grande variabilidade dos resultados no controle da rizoctoniose em função dos diferentes isolados e densidades de inóculo de *R. solani*, assim como da resposta instável em diferentes tipos de solos, podem ser fatores limitantes à utilização dos isolados de *Bacillus* spp. no tratamento de sementes de caupi em condições de campo.

Palavras-chaves: *Vigna unguiculata*, *Rhizoctonia solani*, doença radicular, controle de doença, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* fluorescentes.

ABSTRACT

The Rhizoctonia canker, caused by *Rhizoctonia solani*, is an important disease of cowpea in northeastern Brazil. This work aimed to select cowpea rhizobacteria as biocontrol agents of Rhizoctonia canker and to assess the stability of the control by promising isolates for different isolates and inoculum densities of the pathogen, and soil types. Samples of cowpea plants with no symptoms of root diseases were collected in 22 fields and 87 bacterial isolates were obtained from their rhizoplane, with 59 strains of *Bacillus* spp. and 28 strains of fluorescent *Pseudomonas* spp. These strains were evaluated for their efficacy in reducing the severity of Rhizoctonia canker of cowpea under greenhouse conditions. In a preliminary screening cowpea seeds (cv. IPA-206) were immersed in bacterial suspensions (approximately 10^8 cells/mL) prepared in 0.1 M MgSO₄ solution and sown in trays containing unsterilized soil (Camaragibe) previously infested (isolated CMM-2656) with 150 mg of substrate (rice) colonized/kg soil. The assessment of disease severity was determined after 15 days, using a scale from 0 to 4, where 0 = no symptoms and 4 = non-germinated seeds and/or non-emerged plantlets. Only five bacterial strains (B-05, B-13, B-63, B-65 and B-71), all from the genus *Bacillus*, reduced levels of disease severity above 45% and were evaluated in relation to five isolates (CMM-2651, CMM-2654, CMM-2666, CMM-2675 and CMM-2682) and three inoculum densities (200, 250 and 300 mg/kg soil) of *R. solani*, and five soil types (Aldeia, Goiana, Itapirema, Pombos and Vitória). Only the bacterial strain B-71 showed similar levels of Rhizoctonia canker control induced by different isolates of the pathogen, with an average of 24.5% in the reduction of severity levels. The strain B-65 had the highest levels of disease control at the three inoculum densities of *R. solani*, with an average of 22.2%. It was evident the influence of soil on the effectiveness of the strains. The great variability of results in the control of Rhizoctonia canker due to different isolates and inoculum densities of *R. solani* as well as the unstable response in different soil types may be factors limiting the use of *Bacillus* spp. in the treatment of cowpea seeds in field conditions.

Keywords: *Vigna unguiculata*, *Rhizoctonia solani*, root disease, disease control, *Bacillus* spp., fluorescent *Pseudomonas*.

Capítulo I

Introdução Geral

INTRODUÇÃO GERAL

O caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] também conhecido como feijão de corda, macassar ou feijão-fradinho, é uma dicotiledônea de origem africana pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae* e subfamília *Faboideae* (*Papilionoídea*). Apresenta alta rusticidade e adaptabilidade às condições de estiagem prolongadas e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade (OLIVEIRA; CARVALHO, 1988). Essa capacidade especial de adaptação nos solos de baixo teor de fósforo se deve ao fato de que raízes de feijão caupi desenvolvem efetivas associações micorrízicas, melhorando o conteúdo de fósforo (P) disponível no solo (VALENZUELA; SMITH, 2002).

É uma leguminosa anual que possui uma grande diversidade fenotípica que lhe garante maior versatilidade para diversos nichos ecológicos (EHLERS; HALL, 1997), sendo cultivada em escala mundial numa área de 12,5 milhões de hectares, distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais da África, da Ásia e das Américas, com produção de 3,6 milhões de toneladas de grãos (FAO, 2009). Varia muito em hábito de crescimento, podendo ser curta, ereta tipo arbusto, e outras são altas e do tipo liana (trepadeira). O caupi cresce rapidamente, atingindo uma altura de 48-61 cm, quando cultivado sob condições favoráveis (VALENZUELA; SMITH, 2002).

Na alimentação humana o caupi constitui importante fonte de proteínas (23 a 25% em média) e carboidratos, destacando-se pelo alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de possuir baixa quantidade de lipídios que, em média, é de 2% (FROTA et al., 2008). É uma cultura de importante destaque na economia nordestina e de amplo significado social, pois o cultivo do caupi é geralmente praticado por pequenos produtores, que normalmente consomem toda sua produção, constituindo a principal fonte proteica e energética do homem rural (FREIRE FILHO et al., 2005).

O Brasil ocupou em 2005 a terceira posição no ranking mundial de produção de caupi, sendo a região Nordeste responsável por mais de 80% da produção nesse ano. Porém, em 2009, houve uma expressiva queda na produção que levou a região Nordeste a perder seu posto para a região Centro-Oeste. O estado de Pernambuco se destaca como importante produtor de caupi, atingindo em 2009 uma área colhida de 311.672 ha e produção de 129.965 toneladas, sendo que grande parte da produção se concentra nas mesorregiões do Agreste e Sertão (IBGE, 2010). Porém essa produção vem decaindo ao longo do tempo, em função de problemas como: surgimento de doenças, impossibilidade de adoção de tecnologias para

controle das mesmas pelo pequeno agricultor, e inexistência de sistemas eficientes de manejo de algumas doenças relacionadas ao caupi.

Dentre os fatores que limitam a produção de feijão caupi no Brasil, destaca-se a suscetibilidade a doenças e pragas e a falta de adaptação de cultivares locais aos sistemas de cultivo mais difundidos (ARAÚJO, 1988). Dentre as doenças de maior severidade nessa cultura, destaca-se a rizoctoniose, que além do caupi causa grandes danos a outras culturas da mesma família, como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (MICHEREFF FILHO et al., 1996). No estado de Pernambuco, a incidência da rizoctoniose é favorecida pelas condições climáticas da região, principalmente no Agreste Meridional, que por ser uma zona de transição entre o litoral e o sertão, dispõe da combinação ideal para o desenvolvimento da doença, que são temperaturas acima de 30 °C e elevada umidade relativa do ar associada a chuvas frequentes durante o ciclo de cultivo da planta hospedeira (AGRIOS, 2005; NECHET et al., 2009).

O fungo *R. solani* tem como forma sexuada *Thanatephorus cucumeris* Frank., pertencente ao Filo *Basidiomycota*. A fase assexual ocorre mundialmente, causando doenças em uma ampla variedade de plantas cultivadas (SNEH et al., 1991). Suas hifas são bem desenvolvidas, com septos transversais evidentes, e ramificam-se de modo característico, formando ângulo reto com relação à hifa de origem. O micélio é bastante vigoroso, sendo inicialmente hialino, evoluindo para marrom claro e, posteriormente, marrom escuro. Escleródios são formados pelo micélio e atuam como estruturas de resistência que permitem a sobrevivência em condições desfavoráveis por um longo período; são de formato irregular, escuros, e germinam produzindo hifas (VIEIRA, 1983)

Os sintomas das rizoctoniose observados antes da emergência da plântula são o escurecimento dos tecidos da semente, perda da rigidez e tendência à decomposição. No entanto, após a plântula romper a superfície do solo, os sintomas podem ser observados no caule, quase sempre na região do colo. As manchas apresentam-se inicialmente encharcadas, crescem rapidamente, tornam-se escuras e progridem para lesões deprimidas, também de coloração escura, que podem provocar fendilhamento ou constrição do caule. O enfraquecimento do caule pode levar ao tombamento da plântula que é, então, colonizada e decomposta pelo fungo. Tanto a morte da semente como da plântula evidencia-se no campo, pela redução na densidade de plantas, que à primeira vista é atribuída à má germinação da semente (BERGAMIM FILHO et al., 1995). Os sintomas aéreos da doença são observados inicialmente nas folhas próximas ao solo com manchas de formato irregular que coalescem causando uma necrose e a posterior desfolha das plantas e a adesão das folhas da planta pela

teia micelial do fungo. Os sinais são as teias miceliais e os microescleródios formados nos tecidos vegetais (NECHET; HALFELD-VIEIRA, 2006).

Uma das doenças mais comuns causadas por espécies patogênicas de *Rhizoctonia* é a rizoctoniose, tombamento ou damping-off de mudas de diferentes espécies. Além de tombamento, *Rhizoctonia* sp. pode colonizar as sementes em fase de embebição ocasionando a sua morte na fase de pré-emergência (GOULART, 2002).

Em hospedeiras como feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.), pimentão (*Capsicum annuum* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.), o fungo pode ser transportado junto com as sementes, e quando se estabelece no campo permanece indefinidamente, se espalhando com chuva, irrigação, ferramentas ou material propagativo contaminado. Para a maioria das raças deste patógeno, a temperatura ótima para a ocorrência de infecções situa-se entre 15 e 18 °C. Existem, porém, algumas raças que causam danos mais severos quando as temperaturas são superiores a 35° C, especialmente em solos moderadamente úmidos (AGRIOS, 2005).

Rhizoctonia solani é um patógeno habitante do solo geneticamente heterogêneo, com ampla gama de hospedeiros, grande capacidade competitiva saprofítica e que sobrevive colonizando restos de cultura ou mediante estruturas de resistência (PAPAVIZAS; DAVEY, 1961). Por esse motivo é considerado um patógeno de difícil controle e merecedor de estudos sobre métodos alternativos de supressão da doença.

As medidas de controle recomendadas para a rizoctoniose do feijão-caupi são evitar o plantio em áreas sujeitas a elevada umidade e eliminar os restos culturais (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005). Além disso, podem-se destacar outros métodos de controle para patógenos habitantes do solo em geral como o uso de sementes saudáveis, eliminação de plantas daninhas, utilização de espaçamento adequado que permita a aeração do plantio, uso de cobertura morta como barreira física entre o solo e a planta, manutenção do bom estado nutricional das plantas e abstenção do plantio consecutivo na mesma área (POLTRONIERI et al., 1994).

Os métodos de controle químico para as doenças causadas por patógenos habitantes do solo são pouco eficientes ou ainda difíceis de serem aplicados, em parte porque nenhum dos produtos testados e relatados na literatura é capaz de oferecer 100% de proteção a sementes e plântulas (MARINGONI et al. 1992). Outro motivo é a possibilidade de induzir resistência em populações do patógeno (MELO, 1998). Meios de controle alternativos vêm sendo desenvolvidos no intuito de superar as limitações dos métodos supra citados, e dentre eles se destaca o controle biológico, que tem despertado grande interesse por ser um método que não

causa danos a saúde humana e nem ao meio ambiente (OWNLEY; WINDHAM, 2004; MORANDI; BETTIOL, 2009). O controle biológico surge como uma alternativa atrativa na busca de produtos mais saudáveis pela substituição de agroquímicos (FISHER et al., 2010).

Muitos trabalhos têm sido realizados utilizando agentes biológicos que interferem nos processos vitais de fitopatógenos (BARBOSA et al., 1995; NORONHA et al., 1995; SILVEIRA et al., 1995; SILVA et al., 1996; SINDHU et al., 1999; LUZ, 2001; KLOEPPER et al., 2004; BOTELHO; MENDONÇA-HABLER, 2006), demonstrando que se pode obter bons resultados no manejo de algumas doenças pelo uso desse método (MORANDI; BETTIOL, 2009).

O controle biológico consiste na redução na incidência da doença pela destruição total ou parcial da população de patógenos por outros organismos denominados antagonistas (AGRIOS, 2005). Esses organismos antagonistas possuem diversos mecanismos de ação sobre o patógeno, que resultam em seu declínio, pela eliminação da população ou impedindo seu estabelecimento no ambiente. Os antagonistas podem agir através da produção de substâncias antimicrobianas, por meio de competição por nichos ecológicos e por nutrientes, através da produção de compostos antimicrobianos voláteis, e outros mecanismos como, hiperparasitismo, predação, produção de enzimas líticas e toxinas (COOK; BAKER, 1983; BELLOWS, 1999; ROMEIRO, 2007).

A antibiose consiste na interação entre microrganismos onde um produz metabólitos de efeito nocivo ao outro (BETTIOL, 1991), inibindo a germinação, o crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (SILVEIRA, 2001). A competição é a interação entre dois ou mais organismos empenhados na mesma ação na busca por alimento (nutrientes), espaço e oxigênio (BETTIOL, 1991). A competição por espaço e nutrientes é inevitável para os microrganismos habitantes do solo, principalmente na ocupação de sítios de colonização e competição pelos elementos carbono, nitrogênio e ferro, essenciais para a maioria dos fitopatógenos habitantes do solo (PAULITZ, 1990).

O controle biológico se dá quando há redução da população do agente causador da doença através da utilização de uma prática de manejo que visa favorecer o desenvolvimento de organismos antagonistas nativos ou pela introdução de microrganismos selecionados, sabidamente antagonistas do patógeno (MELO, 1998). A aplicação de microrganismos antagonistas pode constituir uma opção potencial para o controle de fitopatógenos residentes do solo e ao equilíbrio biológico. Tal estratégia é apropriada para predadores relativamente agressivos e específicos, mas tem menor valor em situações mais complexas (VALARINI et al., 2003). Após a introdução de um agente microbiano de controle biológico, haverá o seu

estabelecimento em um nicho, seguido da interação com o organismo alvo e outras espécies de organismos (GHINI; BETTIOL, 2000), culminando na supressão da doença se o antagonista for apto a desempenhar essas interações (ATHINSON; McKINLAY, 1995).

O conhecimento do efeito antibiótico e do tipo de interação entre o patógeno e o antagonista é importante para determinar o sucesso da supressão da doença. A introdução de populações comprovadamente antagonistas em solos infestados com agentes patogênicos geralmente promove a supressividade (WELLER et al., 2002).

A microbiolização de sementes constitui um método alternativo, viável economicamente e que pode trazer benefícios à cultura por favorecer o equilíbrio microbiano do solo cultivado. É um sistema ideal de introdução de bioprotetores para o controle das doenças das sementes, formando a primeira barreira de defesa das plantas contra o ataque de microrganismos fitopatogênicos (LUZ, 1993).

Há uma grande quantidade de microrganismos habitantes do solo envolvidos na supressão de doenças, porém estudos demonstram que dentro dessas comunidades microbianas existem alguns agentes estreitamente envolvidos com esse fenômeno e que são comumente observados em análises microbiológicas de solos supressivos (JANVIER, 2007). Entre os principais agentes controladores de doenças de plantas destacam-se microrganismos, como *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp., que vêm apresentando bons resultados, tanto no controle de doenças causadas por patógenos habitantes do solo como nos de parte aérea (BELLOWS, 1999; LU et al, 2010).

Pseudomonas spp. do grupo fluorescente são bactérias Gram-negativas e produzem um pigmento verde-amarelado fluorescente em meio B de King (KING et al., 1954), observado sob luz com comprimento de onda próximo do ultravioleta. Esses organismos podem ser encontrados na água e no solo (STANIER, 1969). As espécies mais importantes desse grupo são *Pseudomonas fluorescens* Migula e *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula, geralmente estudadas com o objetivo de avaliar a promoção de crescimento em plantas, e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula, considerada patogênica a animais (WELLER, 2007).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* do grupo fluorescente possuem muitas características que as tornam bem adaptadas como agentes de biocontrole e de promoção do crescimento. Estes incluem a capacidade de crescerem rapidamente “*in vitro*” e de serem produzidos em massa, utilizarem rapidamente exsudatos de sementes e raízes; colonizarem e se multiplicarem na rizosfera, espermosfera e no interior da planta, produzirem uma gama de metabólitos bioativos, isto é, antibióticos, sideróforos, voláteis e substâncias promotoras do

crescimento, para competir mais agressivamente com outros microrganismos, e adaptarem-se mesmo diante de estresses ambientais (WELLER, 2007).

Os principais mecanismos de biocontrole observados em espécies fluorescentes do gênero *Pseudomonas* são a produção de antibióticos e sideróforos, competição por micronutrientes fornecidos por exsudação de sementes e raízes, bloqueio de sítios de penetração e indução de resistência (BARBOSA et al., 1995). Como exemplo de produção de substâncias antimicrobianas produzidas por espécies fluorescentes de *Pseudomonas*, temos o 2,4 diacetilfloroglucinol (2,4 DAPG) e o ácido fenazina-1-carboxilato (PCA), que atuam inibindo o crescimento de um grande número de fitopatógenos (WELLER et al., 2002). Os sideróforos produzidos por essas bactérias diminuem o desenvolvimento de patógenos na rizosfera devido à ação desses quelantes na disponibilidade de ferro, estabelecendo assim uma competição por esse elemento com os possíveis fitopatógenos presentes no solo, quando em condições limitantes de ferro disponível (JOSHI et al., 2008). Estudos relacionados a produção de sideróforos por rizobactérias estabelecem pelo menos dois tipos diferentes desses agentes quelantes sendo produzidos por *Pseudomonas*, que são a pseudobactina e a pioverdina (ZAGO et al, 2000; MATTHIJS et al., 2007).

Bactérias do gênero *Bacillus* são microrganismos móveis, em forma de bastonete, Gram-positivas e podem ser aeróbias ou anaeróbias facultativas. São resistentes ao calor e a outros agentes destrutivos. Podem oxidar uma ampla faixa de compostos orgânicos e em alguns casos são fermentativas. A maioria delas tem exigências nutricionais simples, requerendo no máximo alguns aminoácidos ou vitaminas B como fatores de crescimento (STANIER, 1969). *Bacillus* são particularmente atraentes para uso prático em biocontrole, porque produzem endósporos estáveis, que podem sobreviver a condições de calor e desidratação (HANDELSMAN; STABB, 1996). A utilização de *Bacillus subtilis* Cohn é um exemplo de uma espécie largamente utilizada em controle biológico, pois a mesma tem propiciado controle de vários fitopatógenos habitantes do solo através do tratamento de sementes (LUZ, 1993; NORONHA et al., 1995).

No que se refere ao controle de patógenos habitantes do solo, a eficiência desse procaríota na supressão da doença pode ocorrer também devido sua superior capacidade de colonização do rizoplano em relação a maioria dos organismos presentes nesse ambiente (CUBETA, et al., 1985). Como também pela estimulação do metabolismo da planta hospedeira, resultando em maior crescimento e ativação dos mecanismos de defesa da planta, o que resultaria no escape ao período crítico de atuação do patógeno (NORONHA et al., 1995). Além disso, algumas bactérias do gênero *Bacillus*, possuem a capacidade de produzir

antibióticos. Um exemplo é o isolado UW85 de *B. cereus* Frankland & Frankland, que suprime doenças causadas por oomicetos. Análise de mutantes da *B. cereus* mostra uma relação significativa entre supressão da doença e a produção de dois antibióticos, zwittermicina A e kanosamina (MILNER et al, 1996a, 1996b).

Visando contribuir para o manejo da rizoctoniose do caupi, este estudo objetivou detectar a presença de rizobactérias do caupi com potencial para o biocontrole da rizoctoniose, em diferentes áreas de plantio, como também avaliar a estabilidade do controle em relação a diferentes isolados, densidades de inóculo de *R. solani* e diferentes tipos de solo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5 ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 637 p.
- ARAÚJO, J. P. P. Melhoramento do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P.; WATT, E. E.(Eds.). **O caupi no Brasil**. Brasília: EMBRAPA-IITA, 1988. p. 251-283
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-caupi: avanços Tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 461-484.
- ATKINSON, D.; MCKINLAY, R. G. Crop protection in sustainable farming systems. In: MCKINLAY, R. G.; ATKINSON, D. **Integrated crop protection: towards sustainability**. Farnham: British Crop Protection Council, 1995. p. 483-488.
- BARBOSA, M. A. G. et al. Biocontrole de *Rhizoctonia solani* em caupi pelo tratamento de sementes com *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 21, p. 151-157, 1995.
- BELLOWS, T. S. Controlling soil-borne plant pathogens. In: BELLOWS, T. S.; FISHER, T. W. (Eds.). **Handbook of biological control**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 699-712. 1999.
- BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. 919 p.
- BETTIOL, W. Componentes de controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa-CNPDA, 1991. p. 1 - 5.
- BOTELHO, G. R.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere of crops - an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 401-416, 2006.
- COOK, R. J.; BAKER, K. F. E. **The nature and practice of biological control of plant diseases**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539 p.

CUBETA, M. A.; MARIMAN, G. L.; SINCLAIR, J. B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated soybean seeds. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, p. 506-509, 1985

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Fields Crop Research**, Oxford, v. 53, p. 187-204, 1997.

FAO. FAOSTAT. **Crops - cow peas, dry**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 04 de jan. 2011.

FISCHER, S. E. et al. Survival of native *Pseudomonas* in soil and wheat rhizosphere and antagonist activity against plant pathogenic fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 97, p. 241-251, 2010.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R.A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

GHINI, R.; BETTIOL, W. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 17, n. 1, p. 61-70, 2000.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 399-402, 2002.

HANDELSMAN, J.; STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, London, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Levantamento sistemático da produção agrícola: dezembro 2010**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010. 41 p.

JANVIER, C. et al. Soil health through soil disease suppression: which strategy from descriptors to indicators. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1-23, 2007.

JOSHI, F.R. et al. Siderophore cross-utilization amongst nodule isolates of the cowpea miscellany group and its effect on plant growth in the presence of antagonistic organisms. **Microbiological Research**, Berlin, v. 163, p. 564-570, 2008.

KING, E. O.; WARD, M. K.; BANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 44, p. 301-307, 1954.

KLOPPER, J. W.; RYU, C.-M.; ZHANG, S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p.1259-1266, 2004.

LU, W. et al. genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain possesses dual Activity against phytopathogenic fungi and insects. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 20, p. 281-286, 2010.

LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 1, p. 33-79, 1993.

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

MARINGONI, A. C.; TOFOLI, J. G.; FREGONESE, L. H. Ação de fungicidas "in vitro" sobre *Rhizoctonia solani* e no controle do tombamento do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 18, p. 269-276, 1992.

MATTHIJS, S. et al. Thioquinolobactin, a *Pseudomonas* siderophore with antifungal and anti-Pythium activity. **Environmental Microbiology**, London, v. 9, p. 425-434, 2007.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos patogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds). **Controle biológico**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998. p. 17-67.

MICHEREFF FILHO, M. et al. Influência de tipos de solo do estado de Pernambuco na intensidade da doença induzida por *Rhizoctonia solani* em feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 19-25, 1996.

MILNER, J. L., STOHL, E. A., HANDELSMAN, J. Zwittermicin A resistance gene from *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, London, v. 178, p. 4266-4272, 1996a.

- MILNER, J. L. et al. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, London, v. 62, p. 3061-3065. 1996b.
- MORANDI, M. A. B., BETTIOL, W. Controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p. 7-14.
- NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Caracterização de isolados de *Rhizoctonia* spp., associados à mela do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), coletados em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, n. 31, p. 505-508, 2006..
- NECHET, K. L., HALFELD-VIEIRA, B. A., SOUZA G. R. **Estudos Epidemiológicos e de Controle da Mela (*Rhizoctonia solani*) do Feijão-Caupi**. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. 26 p. (Embrapa Roraima. Documentos, 12).
- NORONHA, M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 174-178, 1995.
- OLIVEIRA, I. P.; CARVALHO, A. M. A. A cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. In: ARAÚJO, J. P.; WATT, E. A (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p. 65-95.
- OWNLEY, B. H.; WINDHAM, M. T. Biological control of plant pathogens. In: TRIGIANO, R. N.; WINDHAM, M. T.; WINDHAM, A. S. (Eds). **Plant pathology: concepts and laboratory exercises**. Boca Raton: CRC PRESS, 2004. p. 327-336
- PAPAVIZAS, G. C.; DAVEY, C. B. Saprophytic behavior of *Rhizoctonia* in soil. **Phytopathology**, Lancaster, v. 51, p. 693-699, 1961.
- PAULITZ, T. C. Biochemical and ecological aspects of competition in biological control. In: BAKER, R. R. (Ed.). **New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases**. New York: Liss, 1990. p. 713 - 724.
- POLTRONIERI, L. S.; TRINDADE, D. R.; SILVA, J. F. A. F. **Principais doenças do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) no Pará e recomendações de controle**. Belém: Embrapa CPATU, 1994. 24 p. (Embrapa CPATU, Documentos, 75).

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: UFV, 2007. 269 p.

SINDHU, S. S.; GUPTA, S. K.; DADARWAL, K. R. Antagonistic effect of *Pseudomonas* spp. on pathogenic fungi and enhancement of growth of green gram (*Vigna radiata*). **Biology & Fertility of Soils**, Berlin, v. 29, p. 62-68, 1999.

SILVA, J. B. et al. Efeito da bacterização de sementes no controle de *Rhizoctonia solani* em algodoeiro. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 21, p. 342-348, 1996.

SILVEIRA, E. B. et al. Antagonismo de *Bacillus* spp. contra *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, p. 605-612, 1995

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, 2001. p. 71-100.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A. **Identification of *Rhizoctonia* species**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1991. 133 p.

STANIER, R. Y. Grupos importantes de eubactérias unicelulares. In: STANIER, R. Y.; DOUDOROFF, M.; ADELBERG, E. A. (Eds.). **Mundo dos micróbios**. São Paulo: Edgard Blücher & USP, 1969. 564 p.

VALARIN, P. J.; MELO, I. S. de; MORSOLETO, R. V. Controle alternativo da podridão radicular do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L). **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 29, p. 334-339, 2003.

VALENZUELA, H.; SMITH, J. Cowpea. **Sustainable Agriculture: Green Manure Crops**, Honolulu, v. 6, p. 1-3, 2002.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV, 1983. 234 p.

WELLER, D. et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.

WELLER, D. M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over 30 years. **Phytopathology**, St. Paul, v. 97, p.250-256, 2007.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas spp. fluorescentes* – bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32 p.

Capítulo II

Prospecção de rizobactérias para o biocontrole da rizoctioniose do caupi

Submissão: **Revista Ciência e Agrotecnologia**

Lavras - Brasil

1 **Prospecção de rizobactérias para o biocontrole da rizoctoniose do caupi¹**

2 Rhizobacteria prospection for biocontrolling Rhizoctonia canker in cowpea

3 **Marcelo Garcia de Oliveira²**

4 **Rosa de Lima Ramos Mariano³**

5 **Kátia Cilene da Silva Félix⁴**

6 **Yrlânia Lira Guerra⁵**

7 **Sami Jorge Michereff^{6*}**

8 **Resumo** - A rizoctoniose, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani*, é uma importante doença
9 do caupi no Nordeste brasileiro. Este trabalho teve como objetivo efetuar a prospecção de
10 rizobactérias como agentes de biocontrole da rizoctoniose em caupi. Na seleção preliminar
11 foram avaliados 59 isolados de *Bacillus* spp. e 28 de *Pseudomonas* spp. do grupo
12 fluorescente. Sementes de caupi foram imersas nas suspensões bacterianas e plantadas em
13 solo não esterilizado previamente infestado com o patógeno (isolado CMM-2656). A
14 avaliação da severidade da doença foi efetuada aos 15 dias com uma escala de notas de 0 a 4.
15 Cinco isolados bacterianos (B-05, B-13, B-63, B-65 e B-71) do gênero *Bacillus*, propiciaram
16 níveis de redução da severidade superiores a 45% e foram avaliados em relação a cinco
17 isolados e três densidades de inóculo de *R. solani*, bem como cinco tipos de solos. Somente o
18 isolado B-71 apresentou níveis similares de controle da rizoctoniose induzidos pelos
19 diferentes isolados do patógeno, com redução média de 24,5% na severidade. O isolado

* Autor para correspondência

¹ Recebido para publicação em .././2011.

Pesquisa financiada pelo CNPq e tema de dissertação.

² Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco

³ Prof. Dr. do Departamento de Agronomia - Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁴ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁵ Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco

⁶ Prof. Dr. do Departamento de Agronomia – Área de Fitossanidade, Universidade Federal Rural de

Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos - 52171-900, Recife-PE, Brasil,

sami@depa.ufrpe.br

20 B-65 apresentou os maiores níveis de controle da doença nas três densidades de inóculo de *R.*
21 *solani*, com média de 22,2%. Nenhum isolado bacteriano apresentou elevados níveis de
22 controle da rizoctoniose em todos os solos. A grande variabilidade dos resultados no controle
23 da rizoctoniose em função dos diferentes isolados e densidades de inóculo de *R. solani*, assim
24 como tipos de solos, pode ser fator limitante à utilização dos isolados de *Bacillus* spp. no
25 tratamento de sementes de caupi em condições de campo.

26 **Termos de indexação:** *Vigna unguiculata*. *Rhizoctonia solani*. Biocontrole. *Bacillus* spp..
27 *Pseudomonas* fluorescentes.

28
29 **Abstract** - The Rhizoctonia canker, caused by *Rhizoctonia solani*, is an important disease of
30 cowpea in northeastern Brazil. This work aimed to prospect cowpea rhizobacteria as
31 biocontrol agents of Rhizoctonia canker of cowpea. In a preliminary screening 59 strains of
32 *Bacillus* spp. and 28 strains of fluorescent *Pseudomonas* spp. were evaluated. Cowpea seeds
33 were immersed in bacterial suspensions and grown in unsterilized soil previously infested
34 with the pathogen (isolate CMM-2656). The assessment of disease severity was performed
35 after 15 days using a scale from 0 to 4. Five *Bacillus* strains (B-05, B-13, B-63, B-65 and B-
36 71) reduced levels of severity above 45% and were tested in relation to five isolates and three
37 inoculum densities of *R. solani*, and five soil types. Only the strain B-71 showed similar
38 levels of Rhizoctonia canker control induced by different isolates of the pathogen, with an
39 average severity reduction of 24.5%. The strain B-65 had the highest levels of disease control
40 at the three inoculum densities of *R. solani*, with an average of 22.2%. No bacterial strain
41 showed high levels of Rhizoctonia canker control in all soils. The great variability of results
42 in the control of Rhizoctonia canker due to different isolates and inoculum densities of
43 *R. solani*, as well as soil types, can be a limiting factor to the use of *Bacillus* spp. in the
44 treatment of cowpea seeds under field conditions.

45 **Index Terms:** *Vigna unguiculata*. *Rhizoctonia solani*. Biocontrol. *Bacillus* spp.. Fluorescent
46 *Pseudomonas*.

47

48 **Introdução**

49 O caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das leguminosas mais adaptadas,
50 versáteis e nutritivas entre as espécies cultivadas. Em 2008, o Brasil foi o terceiro produtor
51 mundial de caupi, com 1,5 milhões de hectares cultivados e produção de 492,3 mil toneladas
52 (FAO, 2011). Essa leguminosa é produzida predominantemente nas regiões Nordeste e Norte,
53 desempenhando importante papel sócio-econômico. O potencial produtivo do caupi para o
54 Nordeste brasileiro é indiscutível, mas a produtividade é baixa, refletindo fatores adversos
55 como instabilidade pluviométrica, utilização de cultivares com potencial genético reduzido e
56 ocorrência de doenças e pragas (MELO et al., 2005). As doenças constituem importantes
57 fatores de redução da produtividade do caupi, causando perdas na quantidade e qualidade dos
58 grãos (ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005).

59 A rizoctoniose, causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, é uma das doenças mais
60 freqüentes e de maior intensidade no caupi no Nordeste brasileiro (COELHO, 2001;
61 ATHAYDE SOBRINHO et al., 2005). Os sintomas da rizoctoniose se caracterizam por
62 podridões de sementes e de raízes, lesões pardo-avermelhadas bem delimitadas e deprimidas
63 (cancros) na base do caule, resultando no tombamento das plântulas. Os danos são muito
64 grandes, principalmente durante os primeiros 15 dias após o plantio, quando determina a
65 morte da planta (RIOS, 1990).

66 As medidas preconizadas para o controle da rizoctoniose muitas vezes tornam-se
67 inviáveis ou inefetivas, principalmente devido à elevada agressividade do patógeno, ampla
68 gama de hospedeiros, transmissibilidade pelas sementes e alta capacidade de sobrevivência no
69 solo mesmo na ausência da planta hospedeira, assim como por questões econômicas e

70 ecológicas em relação ao uso de produtos químicos no solo (ATHAYDE SOBRINHO et al.,
71 2005).

72 O aumento do conhecimento e os perigos associados à saúde com a aplicação de
73 pesticidas têm despertado o interesse em métodos alternativos de controle de doenças de
74 plantas, com destaque para o controle biológico (AKHTAR; SIDDIQUI, 2010). A introdução
75 de microrganismos adaptados ao micro-habitat do patógeno é um dos aspectos mais
76 relevantes para o sucesso de um programa de controle biológico de doenças de plantas
77 (MARIANO et al., 2005). Neste contexto, microrganismos da rizosfera podem propiciar uma
78 linha de frente contra o ataque de patógenos radiculares e são ideais como agentes de
79 biocontrole (SIDDIQUI, 2006).

80 As bactérias associadas à rizosfera/rizoplano, designadas comumente por rizobactérias,
81 têm se revelado como importantes agentes de biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo
82 (SIDDIQUI, 2006; AKHTAR; SIDDIQUI, 2010), com destaque para as bactérias Gram-
83 positivas formadoras de endósporos do gênero *Bacillus* e as bactérias Gram-negativas
84 produtoras de pigmentos fluorescentes do gênero *Pseudomonas* (WELLER et al., 2002;
85 COMPANT et al., 2005; MARIANO et al., 2005; WELLER, 2007; WHIPPS; MCQUILKEN,
86 2009; AKHTAR; SIDDIQUI, 2010; CORREA; SORIA, 2010).

87 O controle biológico da rizoctoniose do caupi foi investigado anteriormente com a
88 utilização de *Bacillus subtilis* (NORONHA et al., 1995) e *Pseudomonas* fluorescentes
89 (BARBOSA et al., 1995) aplicadas às sementes, sendo obtidos resultados promissores. No
90 entanto, a realização dessa nova prospecção se faz necessária devido à perda da viabilidade
91 dos isolados selecionados e indisponibilidade dos mesmos para a continuidade dos estudos.

92 O presente trabalho teve como objetivos efetuar a prospecção de rizobactérias de caupi
93 como agentes de biocontrole da rizoctoniose e avaliar a estabilidade do controle por isolados

94 promissores em relação a diferentes isolados e densidades de inóculo do patógeno, bem como
95 diferentes tipos de solos.

96

97 **Material e métodos**

98

99 **Isolamento de rizobactérias**

100

101 Foram efetuadas coletas de raízes, contendo solo aderente, em 22 áreas de plantio de
102 caupi nos estados de Alagoas, Paraíba e Pernambuco, na região Nordeste do Brasil, onde não
103 ocorriam plantas com sintomas de doenças causadas por fungos habitantes do solo. Amostras
104 de raízes secundárias foram cortadas em segmentos de 3 mm, sendo retirada uma alíquota de
105 0,5 g e colocada em tubo de ensaio contendo 4,5 mL de solução salina a 0,85% (8,5g de NaCl
106 em 1000 mL de água destilada) esterilizada (GOMES et al., 2005). Posteriormente, os tubos
107 foram submetidos à agitação em banho ultrassom, na potência de aproximadamente 40 KHz,
108 por 10 minutos. Para isolamento de *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram transferidas
109 alíquotas de 0,1 mL das suspensões para placas de Petri contendo meio B de King - KB
110 (KING et al., 1954) nas diluições de 10^{-3} e 10^{-4} . Para isolamento de *Bacillus* spp., as diluições
111 foram submetidas à banho-maria de 80°C por 20 minutos (SNEATH, 1986) e posteriormente
112 distribuídas em meio ágar nutritivo - AN (TUIITE, 1969). Após 48 horas de incubação à
113 temperatura de 25 ± 2 °C, colônias bacterianas diferentes foram repicadas e plaqueadas pelo
114 método de estrias para os respectivos meios de cultura até não apresentarem contaminações, e
115 mantidas em tubos de ensaio para caracterização. Os isolados bacterianos foram
116 caracterizados como *Bacillus* spp. conforme Sneath (1986) e como *Pseudomonas* spp. do
117 grupo fluorescente conforme Lelliot e Stead (1987). Todos os isolados foram preservados em

118 tubos de ensaio contendo o meio ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura - NYDA
119 (TUIITE, 1969) e armazenados a 5 °C.

120

121 **Fitopatígeno e preparo do inóculo**

122

123 Foram utilizados seis isolados de *R. solani* (CMM-2651, CMM-2654, CMM-2656,
124 CMM-2666, CMM-2675 e CMM-2682), pertencentes ao grupo de anastomose 4 (AG-4),
125 obtidos de plantas de caupi com sintomas de tombamento e cancro do hipocótilo, procedentes
126 de áreas de plantio comercial do estado de Pernambuco. O inóculo de *R. solani* foi preparado
127 em frascos Erlenmeyer contendo substrato constituído de 250 g de arroz parbolizado e 150
128 mL de água destilada. Após a esterilização em autoclave (120 °C, 1 atm, 30 min), em cada
129 frasco foram colocados cinco discos de 5 mm de diâmetro de cultura do fungo, previamente
130 cultivado em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) durante sete dias à temperatura de
131 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os frascos foram incubados a 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 12
132 horas, sendo agitados a cada dois dias para distribuição uniforme dos propágulos do fungo no
133 substrato. Após 10 dias, o substrato colonizado por *R. solani* foi retirado dos frascos
134 Erlenmeyer e acondicionado em sacos de papel para secagem a 35 ± 2 °C por 48 horas.
135 Posteriormente, foi triturado em liquidificador durante 3 min., peneirado em malha de 16
136 mesh e pesado conforme a alíquota a ser incorporada ao solo.

137

138 **Preparo das suspensões bacterianas**

139

140 As suspensões de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. fluorescentes foram preparadas a
141 partir de culturas com 48 horas de crescimento em meio NYDA, sendo as células transferidas
142 para tubos de ensaio com 10 mL de MgSO₄ 0,1 M, com posterior agitação mecânica por 1

143 minuto. A concentração das soluções foi determinada em fotocolorímetro modelo 500M
144 (Analyser, São Paulo, SP, Brasil) para $A_{570} = 0,52$. A cada suspensão foi adicionado uma gota
145 do espalhante adesivo Tween 20 (polioxyethylene sorbitan mono-oleate, Vetec do Brasil
146 Ltda., São Paulo, Brasil), na concentração de 0,05%.

147

148 **Tratamento das sementes, plantio e solos**

149

150 Sementes de caupi, cv. IPA-206, foram desinfestadas em solução de NaOCL 1,5% por
151 três minutos e lavadas em água corrente. Após secagem por 45 minutos à temperatura de
152 25 ± 2 °C, as sementes foram imersas nas suspensões bacterianas por 30 min. As testemunhas
153 consistiram de sementes desinfestadas e imersas em solução de $MgSO_4$ 0,1 M adicionada de
154 Tween 20 (0,05%). Após secagem por duas horas, as sementes foram plantadas em amostras
155 de solos não esterilizadas, coletadas no estado de Pernambuco em áreas não utilizadas
156 previamente para o cultivo de leguminosas e sem histórico de ocorrência de doenças
157 radiculares. As classes texturais e as características químicas dos solos utilizados encontram-
158 se na Tabela 1.

159

160 **Seleção preliminar de isolados de rizobactérias com potencial de biocontrole da** 161 **rizoconiose do caupi**

162

163 Foram avaliados 87 isolados bacterianos, sendo 59 de *Bacillus* spp. e 28 de
164 *Pseudomonas* spp. fluorescentes, quanto à eficiência na redução da severidade da rizoconiose
165 do caupi sob condições de casa de vegetação. As sementes tratadas com as suspensões
166 bacterianas foram plantadas no solo de Camaragibe, acondicionado em bandejas plásticas
167 (18x12x4 cm, 1 kg de capacidade) e previamente infestado com substrato colonizado por *R.*

168 *solani* (isolado CMM-2656) na densidade de 150 mg/kg de solo. Em cada bandeja foram
169 plantadas nove sementes. A testemunha absoluta consistiu da utilização de solo não infestado
170 e plantio de sementes não bacterizadas, imersas em solução de $MgSO_4$ por 30 min., enquanto
171 a testemunha relativa consistiu de solo infestado pelo patógeno e plantio das sementes não
172 bacterizadas.

173 A severidade da rizoctoniose foi avaliada aos 15 dias após o plantio, com o auxílio de
174 escala de notas variando de 0 a 4 (NORONHA et al., 1995), onde: 0 = sem sintomas; 1 =
175 hipocótilo com pequenas lesões; 2 = hipocótilo com grandes lesões, sem constrição; 3 =
176 hipocótilo totalmente constricto, mostrando tombamento; e 4 = sementes não germinadas e/ou
177 plântulas não emergidas. Com esta avaliação foi calculado o índice de severidade da
178 rizoctoniose (SVR) em cada bandeja, pela expressão: $SVR = [\Sigma(\text{grau da escala} \times$
179 $\text{freqüência})/(\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$ (McKINNEY, 1923).
180 Com os dados de SVR foi calculada a porcentagem de redução da severidade da doença
181 (RSD), pela expressão: $RSD (\%) = [(SVR_{te} - SVR_{tr})/SVR_{te}] \times 100$, onde SVR_{te} = severidade
182 da doença na testemunha relativa e SVR_{tr} = severidade da doença no tratamento com o
183 candidato antagonista. O delineamento estatístico utilizado foi em blocos ao acaso, com
184 quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma bandeja com nove sementes.

185 Com os dados de RSD obtidos foi construído um gráfico de freqüência dos isolados
186 bacterianos, considerando os níveis de 0-10, 11-20, 21-30, 31-45 e >45%. Os isolados
187 bacterianos que propiciaram níveis de redução da severidade da doença superiores a 45%
188 foram selecionados para testes subseqüentes de estabilidade do controle da rizoctoniose em
189 relação a diferentes isolados e densidades de inóculo do patógeno, bem como a diferentes
190 tipos de solos.

191

192 Eficácia das rizobactérias sobre diferentes isolados de *Rhizoctonia solani*

193

194 Os cinco isolados bacterianos selecionados preliminarmente como potenciais
195 biocontroladores da rizoctoniose (B-05, B-13, B-63, B-65 e B-71) foram avaliados em relação
196 a cinco isolados de *R. solani* (CMM-2651, CMM-2654, CMM-2666, CMM-2675 e CMM-
197 2682), previamente inoculados no solo de Camaragibe pela adição de substrato colonizado na
198 densidade de 150 mg/kg de solo. Os procedimentos de plantio do caupi e avaliação da doença
199 foram os mesmos utilizados na seleção preliminar. O delineamento experimental foi em
200 blocos ao acaso, em arranjo fatorial 5x5, representado por cinco candidatos antagonistas e
201 cinco isolados do patógeno, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma
202 bandeja com nove plantas. Os dados de RSD foram transformados em raiz ($x+0,5$) e
203 submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível
204 de 5% de probabilidade.

205

206 Eficácia das rizobactérias sob diferentes densidades de inóculo de *Rhizoctonia solani*

207

208 Os cinco isolados bacterianos selecionados preliminarmente foram avaliados sob três
209 níveis de inóculo de *R. solani*. As sementes foram tratadas com as suspensões bacterianas e
210 plantadas em bandejas contendo o solo de Camaragibe previamente infestado com substrato
211 colonizado por *R. solani* (isolado CMM-2656) nas densidades de 200, 250 e 300 mg/kg de
212 solo. Os procedimentos de plantio do caupi e avaliação da doença foram os mesmos utilizados
213 na seleção preliminar. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em arranjo
214 fatorial 5x3, representado por cinco candidatos antagonistas e três densidades de inóculo do
215 patógeno, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma bandeja com nove

216 plantas. Os dados de RSD foram transformados em raiz ($x+0,5$) e submetidos à análise de
217 variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

218

219 **Eficácia das rizobactérias promissoras em diferentes tipos de solos**

220

221 Os cinco isolados bacterianos selecionados preliminarmente foram avaliados em relação
222 ao controle da rizoctoniose em cinco solos (Aldeia, Goiana, Itapirema, Pombos e Vitória),
223 previamente infestados pela adição de substrato colonizado por *R. solani* (isolado CMM-
224 2656) na densidade de 150 mg/kg de solo. Os solos foram analisados quanto a sua
225 composição química e física, conforme Embrapa (1997).

226 Os procedimentos de plantio do caupi e avaliação da doença foram os mesmos
227 utilizados na seleção preliminar. O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, em
228 arranjo fatorial 5x5, representado por cinco candidatos antagonistas e cinco tipos de solos,
229 com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma bandeja com nove plantas.
230 Os dados de RSD foram transformados em raiz ($x+0,5$) e submetidos à análise de variância,
231 sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

232 Durante o período de execução dos experimentos, a temperatura na casa de vegetação
233 foi de $28\pm 3,2$ °C e umidade relativa de $74\pm 8,7$ %.

234

235 **Resultados e discussão**

236

237 **Seleção preliminar de isolados de rizobactérias com potencial de biocontrole da** 238 **rizoctoniose do caupi**

239

240 Foram obtidos 59 isolados de *Bacillus* spp. e 28 isolados de *Pseudomonas* spp.
241 fluorescentes do rizoplano de plantas de caupi, coletadas em 22 áreas nos estados de Alagoas,
242 Paraíba e Pernambuco. Quando esses isolados foram testados como agentes potenciais de
243 biocontrole da rizoctoniose em caupi, a maioria (81,6%) propiciou reduções nos níveis de
244 severidade da doença entre 10 e 45%, enquanto somente cinco isolados (5,8%) propiciaram
245 reduções superiores a 45% nos níveis de severidade da doença (Figura 1). Esses resultados
246 demonstram a possibilidade da obtenção de antagonistas a *R. solani* a partir do isolamento de
247 bactérias do rizoplano de plantas sem sintomas de doenças radiculares, como evidenciado em
248 outros estudos (CHIN-A-WOENG et al., 2008).

249 Os cinco isolados bacterianos mais promissores como agentes de biocontrole da
250 rizoctoniose do caupi (B-05, B-13, B-63, B-65 e B-71) pertenciam ao gênero *Bacillus*,
251 confirmando as observações sobre o grande potencial desse gênero bacteriano como agente de
252 biocontrole de doenças de plantas (GARDENER et al., 2009; CORREA; SORIA, 2010),
253 inclusive da rizoctoniose do caupi (NORONHA et al., 1995).

254 A maior adaptação dos isolados de *Bacillus* ao ambiente da esfermosfera e conseqüente
255 controle de cancos no hipocótilo e tombamento de plantas de caupi podem estar relacionados
256 à capacidade de colonização do rizoplano, produção de antibióticos e formação de endósporo.
257 No entanto, não se descarta ainda a hipótese da estimulação do metabolismo do hospedeiro,
258 resultando em maior crescimento e/ou ativação de mecanismos de defesa da planta
259 (KLOEPPER et al., 2004), o que possibilitaria um escape ao período crítico de atuação do
260 patógeno, como relatado em amendoim (TURNER; BACKMAN, 1991).

261 Os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes apresentaram menor eficácia no
262 controle da rizoctoniose do caupi que os isolados de *Bacillus* spp., motivo pelo qual não
263 foram selecionados para os testes subseqüentes de estabilidade do biocontrole. Bactérias do
264 gênero *Pseudomonas* pertencentes ao grupo fluorescente têm sido intensivamente estudadas

265 como agentes de biocontrole de doenças radiculares, sendo obtido sucesso em muitas
266 situações (WELLER, 2007), inclusive no controle da rizoctoniose em caupi (BARBOSA et
267 al., 1995). No entanto, tem sido observado que formulações comerciais baseadas em células
268 de *Pseudomonas* fluorescentes têm menor eficiência no controle de doenças que *Bacillus*
269 devido à falta de viabilidade em longo prazo, como consequência da incapacidade de formar
270 endosporo (KLOEPPER et al. 2004; WHIPPS; MCQUILKEN, 2009).

271

272 **Eficácia das rizobactérias promissoras sobre diferentes isolados de *Rhizoctonia solani***

273

274 Os cinco isolados de *Bacillus* spp. diferiram significativamente entre si ($P \leq 0,05$) quanto
275 à capacidade de reduzir a severidade da rizoctoniose em plântulas de caupi, provocada por
276 diferentes isolados de *R. solani*. Os isolados bacterianos B-05, B-13 e B-65 demonstraram
277 maior eficácia no controle da doença causada pelo isolado CMM-2651, enquanto B-63 se
278 destacou em relação ao isolado CMM-2654, diferindo dos resultados obtidos em relação aos
279 demais isolados de *R. solani* (Figura 2). Por outro lado, os isolados B-63 e B-65 não
280 propiciaram nenhuma redução na severidade da doença induzida pelo isolado CMM-2682 do
281 patógeno, o mesmo ocorrendo com o isolado B-05 em relação ao isolado CMM-2666. Apenas
282 o isolado bacteriano B-71 apresentou níveis similares de controle da rizoctoniose induzidos
283 pelos diferentes isolados do patógeno (Figura 2), com redução média de 24,5% nos níveis de
284 severidade da doença. Os demais isolados bacterianos, além de apresentarem grande variação
285 na eficácia sobre os diferentes isolados de *R. solani*, propiciaram reduções médias nos níveis
286 de severidade da doença variando de 9,4% (B-13) a 14,3% (B-65).

287 As variações na eficácia do controle da doença apresentadas pela maioria dos isolados
288 de *Bacillus* spp. conforme o isolado de *R. solani* indicam a ocorrência de variabilidade na
289 virulência entre os isolados do patógeno, como já comprovado em outros estudos

290 (ANDRADE et al., 2005; MICHEREFF et al., 2008). O reduzido espectro de atividade
291 demonstrado pelos isolados B-05, B-63 e B-65 é uma característica preocupante,
292 principalmente quando se considera a alta variabilidade genética de *R. solani* (VILGALYS;
293 CUBETA, 1994). Além disso, o alto grau de especificidade de ação de alguns isolados de
294 *Bacillus* spp. para determinados isolados de *R. solani*, como demonstrado pelos isolados B-63
295 e B-65 no presente estudo é semelhante ao constatado previamente com outros isolados desse
296 gênero bacteriano (ANDRADE et al., 1994; NORONHA et al., 1995), podendo constituir um
297 obstáculo ao uso no controle biológico da rizoctoniose em caupi em condições de campo,
298 onde as populações do patógeno não são uniformes. Por outro lado, a elevada estabilidade
299 apresentada pelo isolado bacteriano B-71 em relação aos diferentes isolados de *R. solani* é
300 uma característica extremamente desejável em um agente de biocontrole.

301

302 **Eficácia das rizobactérias promissoras sob diferentes densidades de inóculo de**
303 ***Rhizoctonia solani***

304

305 Quando aplicados como tratamento de sementes em relação a três densidades de inóculo
306 de *R. solani*, os isolados de *Bacillus* spp. diferiram entre si ($P \leq 0,05$) quanto à capacidade de
307 reduzir a severidade da rizoctoniose em plântulas de caupi (Figura 3). Na maioria das
308 situações, a eficácia do biocontrole diminuiu com o incremento da densidade do inóculo do
309 patógeno. Os isolados bacterianos B-63, B-65 e B-71 demonstraram maior eficácia no
310 controle da doença no menor nível de densidade de inóculo avaliado (200 mg de substrato
311 colonizado por *R. solani*/kg de solo), enquanto os isolados B-05 e B-13 apresentaram níveis
312 similares de redução da severidade da doença nas densidades de 200 e 250 mg/kg de solo. Os
313 isolados B-13, B-63 e B-71 não propiciaram nenhuma redução na severidade da doença na
314 maior densidade de inóculo do patógeno (250 mg/kg de solo) (Figura 2). O isolado bacteriano

315 B-65 apresentou os maiores níveis de controle da doença nas três densidades de inóculo de *R.*
316 *solani*, com média de 22,2%, enquanto os demais isolados bacterianos propiciaram reduções
317 médias nos níveis de severidade da doença variando de 2,5% (B-05) a 5,9% (B-63). A
318 capacidade de proteção do sítio de infecção pela rizobactéria, mesmo em elevados níveis de
319 densidade de inóculo do patógeno no solo, pode ser um atributo chave dos agentes de
320 biocontrole na redução ou supressão de algumas doenças de plantas (PLIEGO et al., 2010).
321 Nesse contexto, a eficácia demonstrada pelo isolado B-65 sob diferentes densidades de
322 inóculo de *R. solani* evidencia a maior capacidade de adaptação deste isolado bacteriano a
323 condições de infestação natural do solo pelo patógeno.

324

325 **Eficácia das rizobactérias promissoras em diferentes tipos de solos**

326

327 Na avaliação da estabilidade do biocontrole da rizoctoniose do caupi em solos com
328 características físico-químicas distintas, ficou evidente a influência do solo na eficácia dos
329 isolados bacterianos promissores (Figura 4). Nenhum isolado bacteriano apresentou elevados
330 níveis de controle da doença em todos os solos. O isolado B-13 reduziu em 34,2% a
331 severidade da rizoctoniose no solo de Vitória e não teve nenhum efeito sobre a severidade da
332 doença no solo de Pombos. De maneira similar, os isolados B-05 e B-71 reduziram em 15,8%
333 e 17,6% a severidade da doença nos solos de Itapirema e Goiana, respectivamente, mas não
334 tiveram nenhum efeito sobre a severidade da doença no solo de Aldeia. Somente o isolado
335 bacteriano B-65 apresentou algum nível de controle da doença em todos os solos, com
336 eficácia máxima (16%) nos solos de Goiana e Vitória, e mínima (3,7%) no solo de Aldeia. O
337 comportamento patogênico de *R. solani* tem sido vinculado com fatores edáficos de natureza
338 biótica e abiótica, resultando em diferenças entre os solos quanto à supressividade ou
339 conducividade à rizoctoniose (MICHEREFF FILHO et al., 1996). A instabilidade no controle

340 da rizoctoniose apresentada pelos isolados de *Bacillus* nos diferentes solos indica que a
341 possibilidade de utilização destes em diferentes solos depende do nível de condutividade à
342 rizoctoniose. Fatores de natureza biótica e/ou biótica do solo podem ter sido determinantes
343 para esse comportamento, embora não seja possível destacar um ou um conjunto de fatores
344 responsáveis em todos os solos.

345 Os níveis médios de redução da severidade da doença, observados nos experimentos,
346 indicam a grande virulência e agressividade de *R. solani*, bem como a elevada adaptabilidade às
347 condições ambientais de diferentes tipos de solo. Os possíveis mecanismos de antagonismo
348 envolvidos no controle de *R. solani* pelos isolados de *Bacillus* verificados no presente estudo
349 permanecem sem esclarecimento. No entanto, poucos microrganismos exercem um único
350 mecanismo de biocontrole, uma vez que sua importância relativa pode variar com as condições
351 ambientais e o estado de desenvolvimento do agente antagonista e do patógeno (COMPANT et
352 al., 2005; CORREA; SORIA, 2010)

353 Embora a seleção preliminar tenha indicado o potencial de alguns isolados de *Bacillus*
354 como agentes de biocontrole da rizoctoniose em caupi, os resultados observados nos testes de
355 estabilidade do controle precisam ser considerados como alerta. Provavelmente, a utilização
356 desses isolados bacterianos visando o controle da doença em condições de campo não seja
357 viável, tendo em vista a grande variabilidade dos resultados de controle da rizoctoniose em
358 função dos diferentes isolados e densidades de inóculo de *R. solani*, assim como da resposta
359 instável em diferentes tipos de solos.

360

361 **Referências Bibliográficas**

- 362 AKHTAR, M. S.; SIDDIQUI, Z. A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in
363 biocontrol of plant diseases and sustainable agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.).
364 **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 157-195.
- 365 ANDRADE, D. E. G. T.; GOMES, A. M. A.; SILVA, E. B.; PEIXOTO, A. R.; FERREIRA,
366 A. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Bean seed bacterization with *Bacillus* spp.
367 and fluorescent pseudomonads for *Rhizoctonia solani* biocontrol. In: **Improving Plant**
368 **Productivity with Rhizosphere Bacteria**. Dordrecht: Kluwer, 1994. p. 77-79.
- 369 ANDRADE, D. E. G. T.; SILVA, C. F. B.; SILVA, L. G. C.; MICHEREFF, S. J.; SALES
370 JÚNIOR, R.; ASSIS, T. C. Influência da densidade do inóculo e de isolados de *Rhizoctonia*
371 *solani* na severidade da rizoctoniose do meloeiro. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 18, n. 03, p.
372 164-168, 2005.
- 373 ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e
374 bacterianas. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Feijão-**
375 **Caupi: Avanços Tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 461-484.
- 376 BARBOSA, M. G. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; MARANHÃO, E.
377 Biocontrole de *Rhizoctonia solani* em caupi pelo tratamento de sementes com *Pseudomonas*
378 spp. fluorescentes. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 21, n. 02, p. 151-157, 1995.
- 379 CHIN-A-WOENG, T. F. C.; LAGOPODI, A. L.; MULDER, I. H. M.; BLOEMBERG, G.
380 V.; LUGTENBERG, B. J. J. Visualisation of rhizosphere interactions of *Pseudomonas* and
381 *Bacillus* biocontrol strains. In: VARMA, A.; ABBOTT, L.; WERNER, D.; HAMPP, R.
382 (Eds.). *Plant Surface Microbiology*. Berlin: Springer, 2008. p. 431-448.
- 383 COELHO, R. S. B. Doenças fúngicas do caupi. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA
384 DO CAUPI, 5., 2001, Teresina. **Anais ...** Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2001. p. 321-322.
- 385 COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant
386 growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action,
387 and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington DC, v. 71, n.
388 09, p. 4951-4959, 2005.
- 389 CORREA, O. S.; SORIA, M. A. Potential of bacilli for biocontrol and its exploitation in
390 sustainable agriculture. In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Plant Growth and Health**
391 **Promoting Bacteria**. Berlin: Springer-Verlag, 2010. p. 197-209.
- 392 EMBRAPA. **Manual de Métodos de Análises de Solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: EMBRAPA-
393 CNPS. 1997. 212 p.
- 394 FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **FAOSTAT - agricultural**
395 **statistics database**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 17 fev. 2011.

- 396 GARDENER, B. B. M. Biocontrol of Plant pathogens and plant growth promotion by
397 *Bacillus*. In: GISI, U.; CHET, I.; GULLINO, M. L. (Eds.). **Recent Developments in**
398 **Management of Plant Diseases**. Dordrecht: Springer, 2009. p. 71-79.
- 399 GOMES, A. M. A. MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S.
400 M. P. Isolamento de bactérias para testes de antagonismo. In: MARIANO, R. L. R.;
401 SILVEIRA, E. B. (Eds.). **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2. ed. Recife:
402 Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005, p. 119-125.
- 403 KING, E. O.; WARD, M. K.; BANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of
404 pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Toronto, v. 44, p.
405 301-307, 1954.
- 406 KLOPPER, J. W.; RYU, C.-M.; AND ZHANG, S. Induced systemic resistance and
407 promotion of plant growth by *Bacillus* spp. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1259-1266,
408 2004.
- 409 LELLIOT, R. A.; STEAD, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of**
410 **Plants**. Oxford: Blackwell, 1987. 216 p.
- 411 MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A. Controle biológico de doenças
412 radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.).
413 **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: Universidade
414 Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 303-322.
- 415 MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by
416 *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Saint Paul, v. 26, n. 02, p. 195-
417 218, 1923.
- 418 MELO, F. B.; CARDOSO, M. J.; SALVIANO, A. A. C. Fertilidade do solo e adubação. In:
419 FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.). **Caupi: Avanços**
420 **Tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 229-242.
- 421 MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; SALES JUNIOR, R. Reaction of melon
422 genotypes to *Rhizoctonia solani*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 03, p. 401-404,
423 2008.
- 424 MICHEREFF FILHO, M.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, E. B.; ANDRADE, D. E. G. T.;
425 ANTUNES SOBRINHO, S.; NORONHA, M. A.; MARIANO, R. L. R. Influência de tipos de
426 solos do estado de Pernambuco na intensidade de doença induzida por *Rhizoctonia solani* em
427 feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 21, p. 19-25, 1996.
- 428 NORONHA, M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de
429 sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia**
430 **Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 02, p. 174-178, 1995.

- 431 PLIEGO, C.; RAMOS, C.; VICENTE, A.; CAZORLA, F. Screening for candidate bacterial
432 biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. **Plant and Soil**, 2010.
433 DOI: 10.1007/s11104-010-0615-8
- 434 RIOS, G. P. **Principais Doenças do Caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1990.
435 40 p.
- 436 SIDDIQUI, Z. A. PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: SIDDIQUI, Z.
437 A. (Ed.). **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2006. p. 111–142
- 438 SNEATH, P. H. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P. H.
439 MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (Eds.). **Bergey's Manual of Systematic**
440 **Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1104-1207.
- 441 TUIITE, J. **Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria**. Minneapolis: Burgess, 1969.
442 239 p.
- 443 TURNER, J. T.; BACKMAN, P. A. Factors relating to peanut yield increases after seed
444 treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, v. 75, n. 03, p. 347-353, 1991.
- 445 VILGALYS, R.; CUBETA, M. A. Molecular systematics and population biology of
446 *Rhizoctonia*. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 135-155, 1994.
- 447 WELLER, D.M.; RAAIJMAKERS, J. M.; McSPADDEN GARDENER, B. B.;
448 THOMASHOW, L. S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to
449 plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 40, p. 309-348, 2002.
- 450 WELLER, D. M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: Looking back over
451 30 years. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 02, p. 250-256, 2007.
- 452 WHIPPS, J. M.; MCQUILKEN, M. P. Biological control agents in plant disease control. In:
453 WALTERS, D. (Ed.). **Disease Control in Crops: Biological and Environmentally Friendly**
454 **Approaches**. Sussex: Wiley-Blackwell, 2009. p. 27-61.
455
456

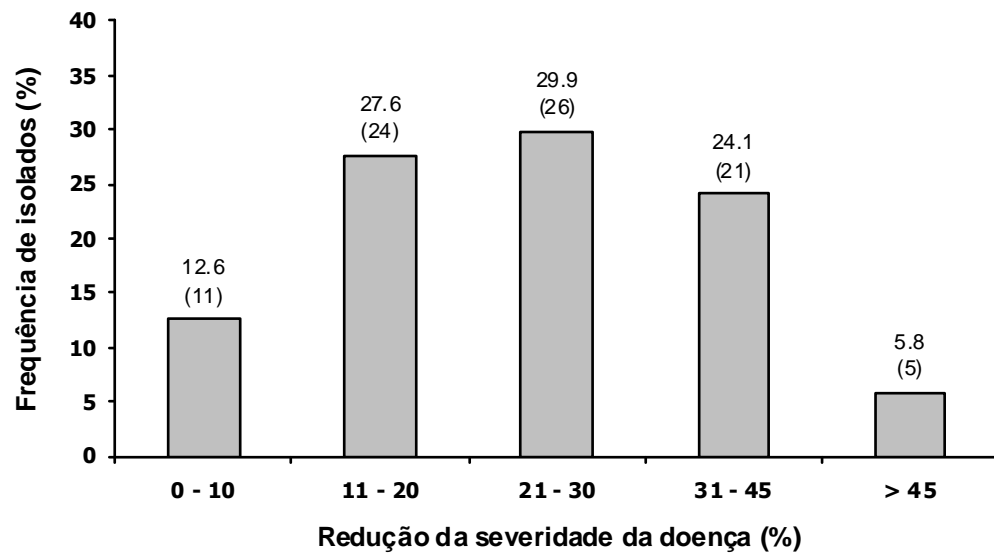
457 **Tabela 1** - Classes texturais e características químicas¹ dos solos do estado de Pernambuco
 458 utilizados no estudo de prospecção de rizobactérias para o biocontrole da rizoctoniose do
 459 caupi
 460

Código do Solo (Origem)	Classe Textural ²	pH	P mg/kg	K -----	Ca -----	Mg cmol/kg	Na -----	Al -----
Aldeia	FAR	4,8	11	0,01	0,41	0,30	0,00	0,72
Camaraçibe	FAGAR	6,0	170	0,34	3,78	3,46	0,14	0,03
Goiana	FAR	5,8	24	0,10	4,66	1,52	0,32	0,00
Itapirema	AR	5,9	212	0,06	1,73	0,81	0,06	0,00
Pombos	FAG	5,6	352	0,52	2,54	5,78	0,92	0,00
Vitória	FAR	6,0	352	0,54	2,23	2,64	0,45	0,00

461

462 ¹ Analisadas conforme Embrapa (1997)463 ² AR = areia, FAG = franco argiloso, FAGAR = franco argilo arenoso, FAR = Franco arenoso

464

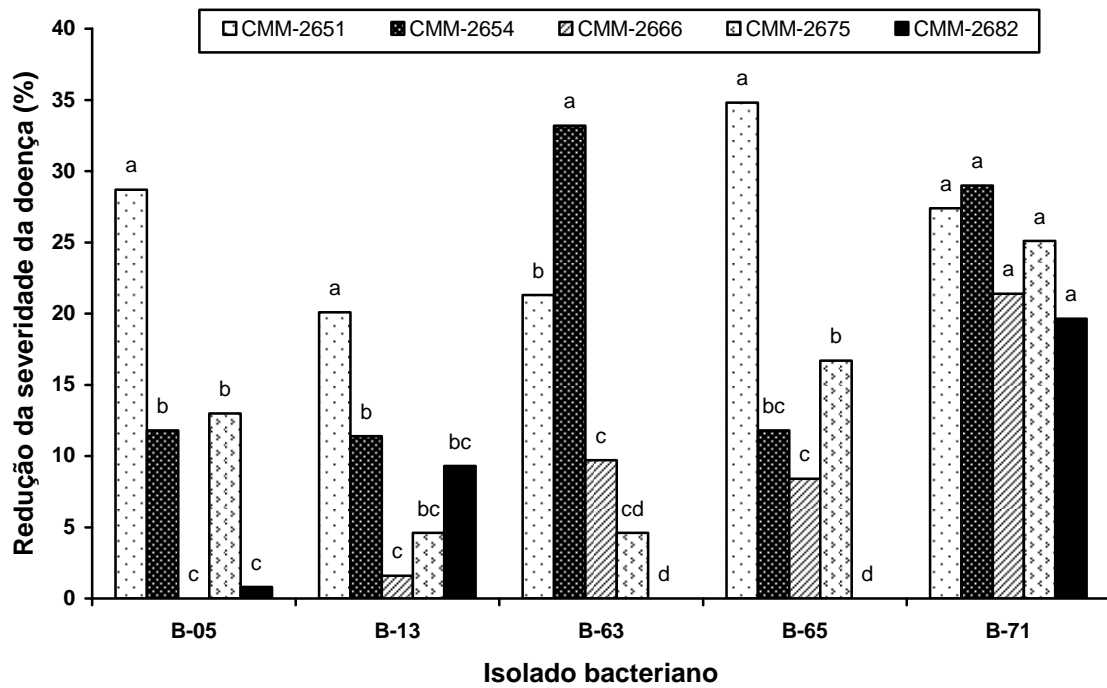


465

466

467 **Figura 1** - Frequência de isolados de rizobactérias em relação aos intervalos de redução da
468 severidade da rizoctoniose do caupi propiciados na seleção preliminar de agentes de
469 biocontrole. Números sobre as barras indicam a frequência de isolados e entre parênteses o
470 número de isolados.

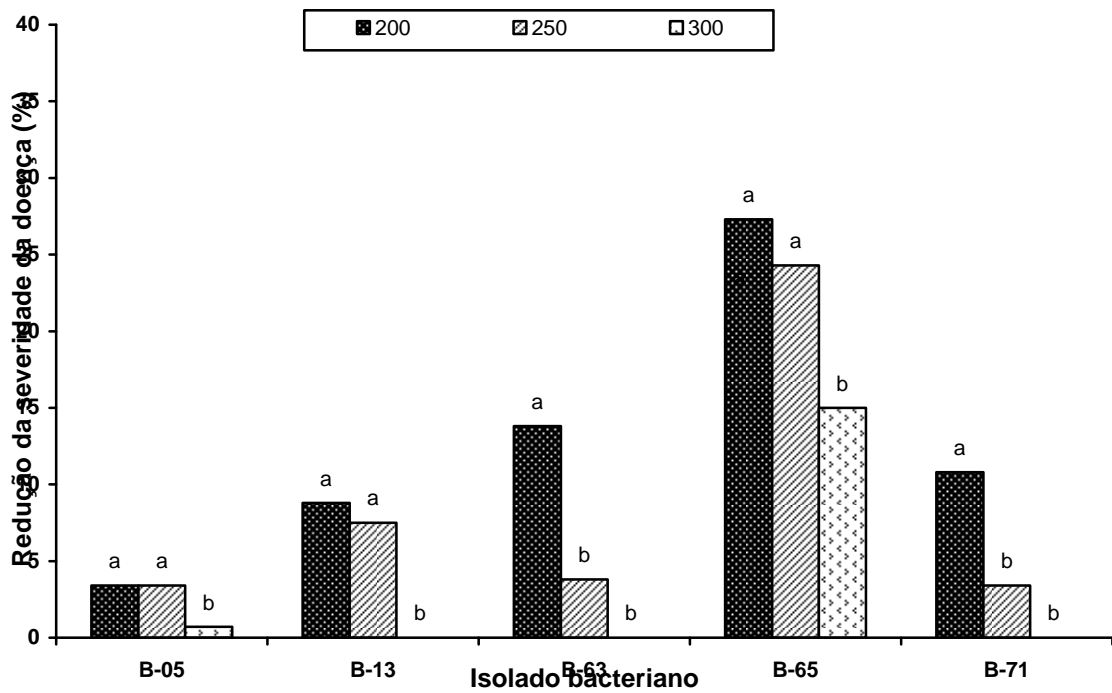
471



472

473 **Figura 2** - Eficácia de isolados de *Bacillus* spp. na redução da severidade da rizoctoniose do
 474 caupi provocada por diferentes isolados de *Rhizoctonia solani*. Médias (barras) seguidas pela
 475 mesma letra dentro de cada isolado bacteriano não diferem estatisticamente entre si pelo teste
 476 Tukey ($\alpha = 0,05$).

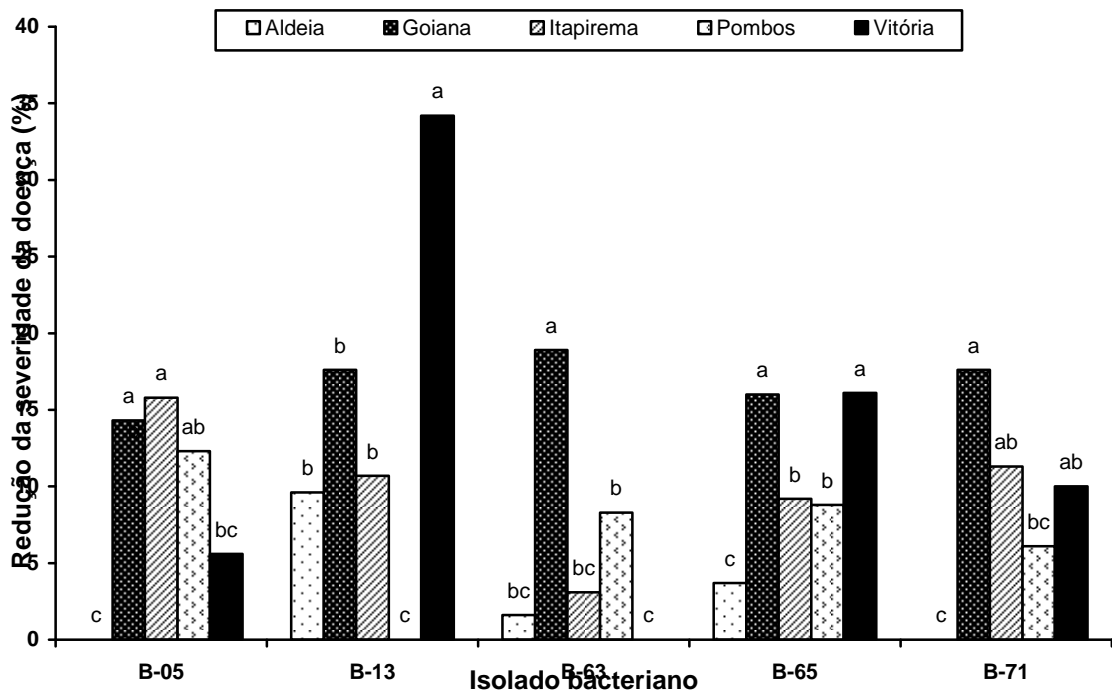
477



478

479 **Figura 3** - Eficácia de isolados de *Bacillus* spp. na redução da severidade da rizoctoniose do
 480 caupi induzida por diferentes densidades de inóculo de *Rhizoctonia solani*. Médias (barras)
 481 seguidas pela mesma letra dentro de cada isolado bacteriano não diferem estatisticamente
 482 entre si pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

483



484

485 **Figura 4** - Eficácia de isolados de *Bacillus* spp. na redução da severidade da rizoctoniose do
 486 caupi em diferentes tipos de solos. Médias (barras) seguidas pela mesma letra dentro de cada
 487 isolado bacteriano não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($\alpha = 0,05$).

Conclusões Gerais

CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. É possível a obtenção de antagonistas potenciais a *R. solani* a partir do isolamento de bactérias do rizoplano de plantas de caupi sem sintomas de doenças radiculares;
2. A utilização os isolados de *Bacillus* spp. selecionados preliminarmente como agentes potenciais de biocontrole da rizoctoniose do caupi podem não ter utilização viável em condições de campo, tendo em vista a grande variabilidade dos resultados de controle da doença em função dos diferentes isolados e densidades de inóculo de *R. solani*, assim como da resposta instável em diferentes tipos de solos.