



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO DE AGRONOMIA

BRUNA ROHRIG

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS, ISOLADAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE
CULTIVO, PARA O CONTROLE DE PATÓGENOS HABITANTES DE SOLO DA
CULTURA DO FEIJÃO**
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CERRO LARGO

2016

BRUNA ROHRIG

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS, ISOLADAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE
CULTIVO, PARA O CONTROLE DE PATÓGENOS HABITANTES DE SOLO DA
CULTURA DO FEIJÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Projeto de trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul, como parte das exigências do Curso de Graduação em Agronomia, para a aprovação na disciplina de TCC - II.

Orientadora: Professora Dra. Juliane Ludwig
Co-orientadora: Dra. Renata Moccellin

CERRO LARGO

2016

DGI/DGCI - Divisão de Gestão de Conhecimento e Inovação

Rohrig, Bruna

Bioprospecção de bactérias, isoladas de diferentes sistemas de cultivo, para o controle de patógenos habitantes de solo da cultura do feijão: Trabalho de Conclusão de Curso/ Bruna Rohrig. -- 2016.

51 f.:il.

Orientador: Juliane Ludwig.

Co-orientador: Renata Moccellin.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de , Cerro Largo, RS, 2016.

1. Bactérias com potencial para o biocontrole de doenças. I. Ludwig, Juliane, orient. II. Moccellin, Renata, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

BRUNA ROHRIG

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS, ISOLADAS DE DIFERENTES SISTEMAS DE
CULTIVO, PARA O CONTROLE DE PATÓGENOS HABITANTES DE SOLO DA
CULTURA DO FEIJÃO

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul.


Orientadora: Prof. Dr. Juliane Ludwig

Coorientadora: Eng^a, Agr^a, Dr. Renata MoCELLIN

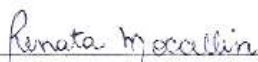
Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

30/03/2016

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Juliane Ludwig – UFFS



Eng^a, Agr^a, Dr. Renata MoCELLIN – UFPel



Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, especialmente aos meus pais, Afonso Silvestre Rohrig e Leonila Joana Schneider, ao irmão, Daniel Rohrig, e ao namorado Jeferson Tonin, por toda compreensão, carinho, paciência e pelo incentivo prestados.

A orientadora, Dr. Juliane Ludwig, pela confiança, dedicação, amizade, e incentivo prestados durante a graduação e realização deste trabalho, por ser o exemplo de profissional a ser seguido. Ainda, a co-orientadora Eng.^a Agr.^a Dr. Renata Moccellin e ao Dr. Ismail Teodoro Souza Junior, por todo auxílio prestado, e contribuições para a melhora do trabalho, meu muito obrigada.

Ao professor, Dr. Daniel Joner Daroit, assim como a Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Cerro Largo, por ceder das instalações laboratoriais para condução do trabalho, o meu muito obrigada.

Aos colegas Rodrigo Ferraz Ramos e Lisiane Sobucki, pelo auxílio prestado não somente para condução deste trabalho, mas sim pela participação ativa em minha trajetória acadêmica, obrigada a vocês.

Aos colegas e amigos que fiz durante a realização do Estágio Curricular Obrigatório, Mauricio Sangiogo, Julia Pelegrineli Fasolin, pelo auxílio prestado na realização de parte do trabalho, assim como troca de experiências e incentivo.

Enfim, agradeço imensamente a todos aqueles, que de uma forma ou outra, auxiliaram na concretização do trabalho.

RESUMO

O feijão *Phaseolus vulgaris* é amplamente cultivado e consumido tanto no Brasil, como em outros países. É uma cultura sensível tanto às condições abióticas, como temperaturas e precipitação, como por condições bióticas, causadas pela interferência por microorganismos, sendo o biocontrole de fitopatógenos uma alternativa sustentável ao manejo de doenças nos agroecossistemas. Com isso, o objetivo do presente trabalho foi isolar bactérias do conjunto rizoplano e endofítico e da rizosfera de diferentes sistemas de produção do feijão, sistema plantio direto e convencional, verificando seu potencial como agentes de biocontrole para fitopatógenos que acometem a cultura, como *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Rhizoctonia solani*. Para isso foram realizados testes de antibiose e testes de biocaracterização dos isolados bacterianos selecionados como: hidrólise de gelatina, amido e caseína, produção de sideróforos, produção de biossurfactantes, produção de amônia, motilidade dos isolados selecionados e produção de compostos voláteis. A partir do desenvolvimento deste trabalho foram selecionados seis isolados bacterianos, RD34, RD27, SD18, RD12, RD10 e RD06, com potencial para o biocontrole de fitopatógenos que acometem a cultura do feijão, e que apresentaram o maior número de mecanismos associados ao biocontrole das doenças estudadas.

Palavras-Chave: Fungos habitantes de solo. Biocontrole. Rizosfera. Rizoplano.

ABSTRACT

Phaseolus vulgaris common beans are widely cultivated and consumed in Brazil as well as in other countries. It is sensitive to both abiotic, such as temperatures and precipitation conditions and biotic conditions caused by interference by microorganisms, being the biocontrol of phytopathogens a sustainable alternative to the management of diseases in agroecosystems. Thus, rhizoplane and rhizosphere bacteria were isolated from different bean production systems, no-tillage system and conventional, verifying their potential as biocontrol agents for crop-infecting phytopathogens such as *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Rhizoctonia solani*. For this, antibiotic tests and biocharacterization tests of the selected bacterial isolates were carried out: gelatin, starch and casein hydrolysis test, siderophores production, biosurfactant production, ammonia production, selected isolates motile and volatile compounds production. From the development of this work, six bacterial isolates, RD34, RD27, SD18, RD12, RD10 and RD06, with potential for the biocontrol of plant pathogens that affect the bean culture, were selected and presented the greatest number of mechanisms associated to the biocontrol of diseases studied.

Keywords: soil fungi. Biocontrol. Rhizosphere. Rhizoplane.

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Fotografia 1 - Sintomas de <i>M. phaseolina</i> em caule (A) e vagens (B) de feijão	17
Fotografia 2 - Picnídios de <i>M. phaseolina</i> visualizados em microscópio estereoscópico (A). Observação em microscópio ótico de picnídio e picnidiósporos de <i>M. phaseolina</i> (B).	176
Fotografia 3 - Hifas de <i>R. solani</i> observadas a partir do microscópio.	18
Fotografia 4 - Apotécios sendo ejetados pelos ascósporos (A). Sintomas e sinais de <i>S. sclerotiorum</i> em vagens de feijão à direita.	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	A CULTURA DO FEIJÃO COMUM (<i>Phaseolus vulgaris</i>).....	11
2.2	PRINCIPAIS PLANTAS DANINHAS, PRAGAS E DOENÇAS DA CULTURA DO FEIJÃO	14
2.2.1	Podridão cinzenta do caule (<i>Macrophomina phaseolina</i>).....	16
2.2.2	Podridão radicular de <i>Rhizoctonia</i> ou Tombamento (<i>Rhizoctonia solani</i>)	17
2.2.4	Mofa branca (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	18
2.3	PRINCIPAIS MÉTODOS DE CONTROLE DE DOENÇAS EM FEIJÃO	19
2.4	CONTROLE BIOLÓGICO.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	LOCAL DO EXPERIMENTO	28
3.2	ISOLAMENTO DOS MICROORGANISMOS.....	28
3.2.1	Produção de compostos antimicrobianos hidrossolúveis e voláteis	30
3.2.3	Biocaracterização dos isolados bacterianos	31
3.2.4	Produção de Sideróforos	32
3.2.5	Teste de motilidade.....	32
3.2.6	Produção de Amônia	32
3.2.7	Produção de Lipopeptídeos surfactantes.....	33
3.2.8	Deteção da atividade Lipolítica	33
3.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	34
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
6	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o segundo maior produtor e consumidor mundial de feijão com área que correspondente a 3.169 mil hectares (ha), e produção de 3.202 mil toneladas do grão, sendo a Índia o primeiro, seguido por Myanmar, China, Estados Unidos e México (FAO, 2012). A safra de inverno é responsável pela maior parte da produção anual de feijão com 46% da produção, concentrada principalmente nos estados de Goiás e Bahia (MAPA, 2015). O feijão é cultivado em diferentes regiões e épocas, possuindo três safras: a safra das águas, a safra das secas e a safra de inverno.

No Brasil, são utilizados três sistemas de plantio para a cultura do feijão: plantio direto, que consiste em não revolver o solo aliado à adoção de práticas conservacionistas; plantio convencional, caracterizado pelo revolvimento do solo e, portanto predominância de solo descoberto. Ambos os sistemas até então apresentados utilizam de insumos sintéticos para correção da fertilidade do solo e produtos químicos no combate de doenças, plantas daninhas e insetos. O terceiro sistema, de base ecológica, vem sendo utilizado em pequenas propriedades rurais com reaproveitamento de insumos oriundos de outras atividades agrícolas, como: esterco bovino, suíno e ou de aves.

Dentre os fatores que delimitam a produção de feijão, encontram-se às condições abióticas, como: temperatura (consideradas ideais na faixa de 15 a 29° C), vento, precipitação (de 300 a 400 mm), fotoperíodo e radiação solar; e condições bióticas, caracterizadas pela interferência causada por microrganismos fitopatogênicos: fungos, bactérias, nematoides e vírus.

As principais doenças do feijão podem ser causadas por patógenos de parte aérea: antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), por bactérias, como Crestamento-bacteriano-comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*), por vírus, como mosaico-dourado (*Bean Golden mosaic virus*) e por fungos habitantes do solo, como mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), podridão-cinzenta-do-caule (*Macrophomina phaseolina*), podridão-radicular-de-rizoctonia (*Rhizoctonia solani*) e podridão-radicular-seca (*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*); com destaque para os últimos, os quais desenvolvem estruturas de sobrevivência no solo (PAULA JUNIOR et al., 2008).

Para o controle das doenças do feijão, são recomendadas medidas físicas, químicas, culturais, genéticas, e biológicas. Em que o uso de microorganismos vem ganhando espaço por ser uma alternativa à utilização de químicos, promovendo o aumento da população de organismos benéficos à cultura (BEDENDO, 2011).

O controle biológico é definido como a redução de inóculo causada por patógenos ou parasitas em atividade ou dormência, por um ou mais organismos, sendo tanto de cunho natural, como pela introdução de um ou mais antagonistas (BAKER & COOK, 1974).

Vários estudos têm apresentado resultados positivos do ponto de vista do controle biológico de fungos na cultura do feijão Nechet et al. (2011) testaram diferentes isolados de rizobactérias, selecionando oito isolados não identificados com potencial antagonico para mela do feijão (*Rhizoctonia solani*), controlando de 33% a 96% a doença, demonstrando controles semelhantes e até mesmo superiores aos alcançados com controle químico. Mansour et al. (2008), estudaram os efeitos de *Trichoderma harzianum* e *Bacillus amyloliquefaciens* sobre *Sclerotinia sclerotiorum* em hortaliças como tomate, berinjela e abóbora, quando inoculadas com o patógeno, obtendo inibição do crescimento, produção de micélio e escleródios de 80%, demonstrando o potencial de bactérias e fungos no controle biológico de doenças.

Bactérias rizosféricas possuem grande potencial para o biocontrole, podendo apresentar uma série de mecanismos de ação envolvidos no biocontrole de doenças, como antagonismo, a partir da produção de compostos antibióticos, produção de compostos voláteis nocivos aos fitopatógenos, competição por nutrientes e espaço em um determinado ambiente, parasitismo dos fitopatógenos e até mesmo a indução de resistência das plantas hospedeiras aos fitopatógenos.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi isolar bactérias de diferentes sistemas de cultivo da cultura do feijão, afim de selecionar potenciais agentes de biocontrole dos fitopatógenos habitantes do solo, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* e *Rhizoctonia solani* da cultura.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A CULTURA DO FEIJÃO COMUM (*Phaseolus vulgaris*)

O feijão, gênero *Phaseolus* L., possui cerca de 55 espécies, onde apenas cinco são cultivadas: *P. vulgaris* L., *P. lunatus* L., *P. coccineus* L., *P. acutifolius* A. G e *P. polyanthus*. A América é o centro de origem dessa cultura, sendo México, Andes e Colômbia os principais centros de domesticação (DEBOUCK, 1993). A principal espécie, *P. vulgaris*, denominado feijão comum, é difundida e cultivada nos cinco continentes (SANTOS, 2004).

O feijão caupi, *Vigna unguiculata* (L.), representa 20% do consumo no Brasil, enquanto que o feijão comum, representado pelas variedades de cores, representa 80% do consumo, sendo amplamente cultivados e consumidos de norte a sul do país (MAPA, 2015). Segundo dados do IBGE (2016), a estimativa de produção da cultura do feijão para o ano de 2016, somando as três safras, é de 3.296.411 toneladas, onde a área total cultivada corresponde a 3.092.854 ha e rendimento médio de 1.066 kg/ha¹.

No Brasil, o consumo de feijão é elevado, sendo a produção do grão absorvida pelo mercado interno. Segundo MAPA (2015) em média os brasileiros consomem por ano 19 quilos de feijão por pessoa. O interesse comercial pelo cultivo do feijão no Brasil se dá por este estar incluso na cesta básica dos brasileiros, principalmente os que possuem menor poder aquisitivo. No que se refere ao valor nutricional do grão, o seu consumo apresenta inúmeras vantagens como alto teor de proteínas, fibra alimentar, presença de carboidratos complexos em altos teores, bem como vitaminas do complexo B (LAJOLO et al., 1996).

As regiões de maior concentração da produção brasileira de feijão, são o Nordeste que aparece como principal produtor com 52,1% da área total cultivada do grão, seguido da região Sul. Para o estado do Rio Grande do Sul, através do Zoneamento Agrícola de Risco Climático para a cultura do feijão para a safra 2015/2016, são indicadas 58 cultivares, predominando as de grão tipo preto. Já a produtividade do feijão apresenta variação com o sistema de cultivo empregado, hábito de crescimento, cultivar, genótipo e condições climáticas na época e sistemas de cultivo (MAPA, 2015).

No que se refere ao hábito de crescimento do feijão, esse pode ser determinado, onde as inflorescências ocorrem do ápice da planta para a base ou indeterminado, onde as inflorescências crescem da base para o ápice, desenvolvendo inflorescências axilares, Neto e

Fancelli (1999), descrevem ainda os estádios fenológicos do feijão, que se estendem do estágio V0 ao estágio R9, sendo o V1 o mais importante, por corresponder pela emergência das plantas.

A cultura do feijão possui três safras específicas, a safra das chuvas, onde o plantio é realizado de julho a agosto, nas regiões Sul, Sudeste, e os estados de Goiás e Bahia são os responsáveis pela produção (MELO et al., 2007). Na safra das secas, o plantio é realizado de janeiro a março, nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste as principais produtoras, correspondendo a 31% da produção anual total de feijão. Já na safra de inverno, o plantio ocorre nos meses de abril a julho, sendo os estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo e Bahia os responsáveis por 23% da produção total (MAPA, 2015).

Os sistemas de cultivo mais utilizados para a cultura do feijão são plantio direto e sistema de cultivo convencional. No plantio convencional o solo é preparado com a utilização de máquinas, consiste na aração, gradagem, semeadura, cultivos subsequentes e intenso revolvimento do solo, a semeadura da cultura é feita utilizando-se de fertilizantes sintéticos para adubação e agroquímicos para eliminação de plantas daninhas, pragas e doenças da cultura (BRAUNAK & DEXTER, 1989). Este sistema fornece como vantagens o aumento da mineralização dos componentes orgânicos do solo pelos microorganismos, devido a incorporação dos resíduos culturais pelo revolvimento, aumento da infiltração da água das chuvas, incorporação dos fertilizantes sintéticos e matéria orgânica, e aumento da aeração do solo. Já as desvantagens deste sistema de forma geral incluem uma maior compactação do solo pela utilização de máquinas pesadas, erosão pela exposição direta do solo aos intempéries, assim como lixiviação dos fertilizantes aplicados (SBCS, 2004).

No plantio direto a semeadura é realizada sobre a palhada de uma cultura anterior, sem utilização de máquinas pesadas, onde o revolvimento é apenas realizado na linha de semeadura, sendo adotadas práticas como rotação de culturas na área, conservação do solo, dentre outras (SANTOS, et al., 2004). Segundo o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, MAPA (2015), as vantagens da adoção desta prática, são principalmente a redução na utilização de insumos químicos, controle da erosão, devido a infiltração mais lenta da água no solo, promovida pela cobertura vegetal pré-existente. Além disso, o sistema plantio direto promove menor dependência do clima, devido a biomassa presente, melhor equilíbrio biodinâmico, assim como controle de plantas daninhas, doenças e nematóides, proporcionado pela cobertura constante do solo. O feijão também é cultivado de forma orgânica principalmente pela

agricultura familiar de subsistência. Segundo o censo agropecuário da agricultura familiar, 70% da produção é proveniente desse sistema (IBGE, 2006).

O manejo de solo adequado é fundamental para o sucesso produtivo da cultura do feijão, por possuir sistema radicular delicado e concentrado na camada de 0-20 cm, sendo solos friáveis, com boa aeração, e em locais não encharcados recomendados para seu cultivo, assim como adubações de correção e reposição de elementos exigidos pela cultura como N, P, K, Ca, Mg, S, e micronutrientes em quantidades menores, como Fe, Cu, Zn, Mn, B e Mo. (CRUZ et al., 2004; FERREIRA, ANDRADE e ARAÚJO, 2004).

Em relação aos atributos biológicos do solo, estudos realizados no Paraná, demonstraram diferenças na respiração basal, sendo estes significativamente mais altos quando sob plantio direto se comparados com sistema convencional, atributo este atribuído à maior atividade biológica no sistema plantio direto, devido principalmente ao acúmulo de matéria orgânica neste sistema (BALOTA et al., 1998). Os mesmos autores também observaram incrementos de 118 e 101% do carbono e nitrogênio respectivamente da biomassa microbiana, evidenciando que a prática do plantio direto proporciona maior biomassa microbiana e menor perda relativa de C no solo a longo prazo, podendo estabelecer maiores diversidades de microorganismos decompositores e maior relação carbono biomassa microbiana/carbono orgânico.

Estudos realizados no Distrito Federal, sob Latossolo Vermelho submetidos à diferentes sistemas de cultivo, convencional e plantio direto, demonstraram diferenças significativas quanto à capacidade de troca de cátions, e a atividade biológica em sistema plantio direto, devido principalmente ao acúmulo de matéria orgânica no solo e a palhada, conferindo proteção à ação direta das oscilações climáticas de temperatura e precipitação (COSTA, GOEDERT e SOUSA, 2006).

O feijão é uma planta sensível à ação tanto de fatores edafoclimáticos abióticos, quanto de organismos vivos, bióticos, proporcionando oscilações no rendimento produtivo (FANCELLI e NETO, 2007). O mesmo autor destaca a problemática de cultivos sucessivos ao longo dos anos nas mesmas regiões, bem como utilização de sistemas de cultivo irrigado sem adoção de práticas culturais adequadas, como rotação de culturas, aliado ainda ao uso excessivo de agrotóxicos, os quais provocam desequilíbrio do agroecossistema, ocasionando a eliminação de organismos que agem como inimigos naturais, contribuindo para o aumento e disseminação de patógenos nas áreas de cultivo e persistência dos mesmos.

Apesar do feijão apresentar uma ampla adaptação edafoclimática, caracterizada pela possibilidade do seu cultivo em até três safras durante o ano em uma grande parte do Brasil (MENEZES, 2001), há interferências de ordem abiótica que podem influenciar a sua produção, com destaque para a radiação solar, que exerce influência direta na taxa de fotossíntese das plantas (DIDONET; SILVA, 2004), precipitação, que pode variar entre 300 e 500 mm e a temperatura ao longo do ciclo da cultura para as diferentes regiões brasileiras, podendo reduzir em torno de 60% o percentual de rendimento de algumas cultivares de feijão, quanto submetido ao déficit hídrico (SILVEIRA et al., 2001).

A cultura do feijão necessita de temperaturas que variam entre 15 e 29°C para o seu desenvolvimento, temperaturas abaixo ou a cima da faixa considerada ideal para o cultivo, podem ocasionar perdas da produtividade final da cultura, sendo a fase reprodutiva a mais sensível, principalmente de enchimento de grãos (FANCELI e DOURADO NETO, 1999).

2.2 PRINCIPAIS PLANTAS DANINHAS, PRAGAS E DOENÇAS DA CULTURA DO FEIJÃO

Além dos fatores abióticos citados anteriormente, e que contribuem negativamente para o baixo rendimento do feijão, destacam-se também fatores bióticos relacionados com a interferência causada por plantas daninhas, pragas e doenças. Além da perda produtiva, a ocorrência desses agentes em cultivos de feijão faz com que os custos de produção sofram aumentos consideráveis (CASTRO et al., 2005).

O feijão é uma planta suscetível a diversas pragas e doenças devido principalmente ao seu cultivo ser realizado em ecossistemas variados e épocas distintas durante o ano. As interferências podem ser por plantas daninhas, pragas e doenças, ocasionadas principalmente por manejo inadequada das áreas de cultivo, como rotação de culturas inadequado, compactação do solo, correção de adubação insuficientes, dentre outras práticas (JÚNIOR, VIEIRA e ZAMBOLINI, L., 2004)

O feijão sofre grande interferência de plantas daninhas principalmente por competição entre os períodos críticos de estabelecimento e desenvolvimento da cultura, que variam entre 10 e 30-40 dias em média (LORENZI, 1994). Dentre as principais plantas daninhas que causam diminuição da produção do feijão estão a grama-seda (*Cynodon dactylon*), capim-colonião

(*Panicum maximum*), capim-massambará (*Sorghum halepense*), sapé (*Imperata cylindrica*), tiririca (*Cyperus rotundus*), capim-fino (*Brachiaria mutica*), capim-camalote (*Rottboelia exaltata*), todas apresentando ciclo de vida perene, necessitando assim um programa de prevenção e manejo por serem de difícil controle (LORENZI, 1994).

A cultura do feijão sofre perdas consideráveis devido ao ataque de pragas, ocorrendo estes desde a sementeira, até a colheita, podendo os danos serem causados em qualquer estágio fenológico da cultura (MODA-CIRINO, 2007). Dentre as principais pragas primárias da cultura do feijão, destacam-se a mosca-branca (*Bemisia tabaci*), a cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*), as vaquinhas (*Diabrotica speciosa* e *Cerotoma arcuata*), o ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*), e os percevejos (*Nezara viridula*, *Piezodorus guildinii* e *Neomegalotomus parvus*). O manejo das pragas deve ser feito a fim de diagnosticar com antecedência a ocorrência de pragas que possam causar danos à cultura, tendo como princípio o manejo integrado de pragas e doenças, utilizando de diferentes métodos de controle associados (GALLO et al., 2002).

Outro fator limitante na produção do feijão são as doenças, que são agentes responsáveis pela redução da produtividade do feijão, além de reduzir a qualidade fisiológica e sanitária das sementes (CASTRO et al., 2005). Sua incidência e severidade podem variar de acordo com a raça do patógeno, região e cultivar (BIANCHINI; MARINGONI e CARNEIRO, 1997).

Dentre as principais doenças fúngicas, destacam-se aquelas de raízes, como mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), murcha-de-fusário (*Fusarium oxysporum*), podridão-cinzenta-do-caule (*Macrophomina phaseolina*), podridão-do-colo (*Sclerotium rolfsii*), podridão-radicular-de-rizoctonia (*Rhizoctonia solani*) e podridão-radicular-seca (*Fusarium solani*), e de parte aérea: antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), mancha angular (*Pseudocercospora griseola*) e oídio (*Erysiphepoly goni*) (PAULA JUNIOR et al., 2008).

Destaque especial é dado para aquelas doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo, como: Podridão radicular de Rhizoctonia ou Tombamento (*Rhizoctonia solani*), Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), Podridão-radicular-seca (*Fusarium solani*), e Podridão cinzenta (*Macrophomia phaseolina*), tendo todas em comum o fato dos patógenos desenvolverem estruturas de sobrevivência no solo, também chamados de patógenos

necrotróficos, sendo assim importante a adoção de práticas agrícolas adequadas para o seu controle (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 1997).

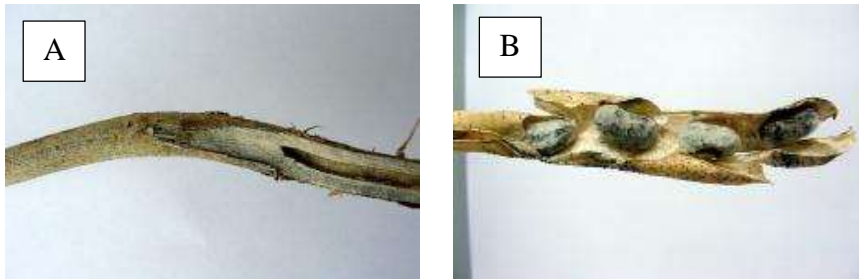
2.2.1 Podridão cinzenta do caule (*Macrophomina phaseolina*)

A podridão cinzenta do caule, causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., é amplamente difundida em diversos países que possuem clima quente aliado a períodos de seca (ATHAYDE SOBRINHO et al., 1998). Este patógeno possui diversas plantas hospedeiras, como o milho, algodão, soja, sorgo dentre outras. Seus sintomas apresentam-se inicialmente como lesões irregulares na haste da planta, de cor escura e pouco deprimidas (DHINGRA e SINCALIR, 1978).

A sobrevivência do patógeno se dá pelo desenvolvimento de estruturas chamadas escleródios, que são capazes de sobreviver no solo e em restos de cultura em forma de picnídios (SHORT e WYLLIE, 1978). Já a disseminação do agente causal pode ser desde contaminação de máquinas e equipamentos utilizados no preparo dos cultivos agrícolas, até águas de irrigação, sementes sem procedência, vento e animais (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 1997). É uma doença a qual ocorre principalmente em regiões de temperaturas quentes durante dias consecutivos (ITO et al., 2003). A temperatura ideal para que ocorra a infecção é de 27°C por vários dias, aliado ao estresse hídrico da planta (SANDHU e SINGH, 1999).

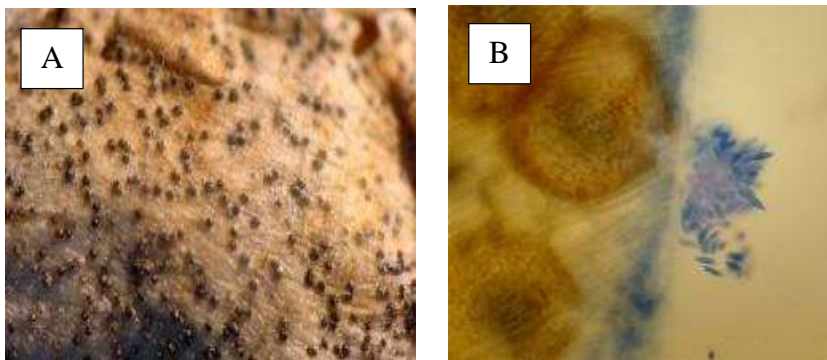
Ao longo do período de infecção da planta, as lesões adquirem coloração cinza, podendo ocorrer clorose das folhas, murcha, e até mesmo a morte de ramos ou de toda planta. Com o avanço das lesões, pode haver a quebra dos galhos, devido ao enfraquecimento da planta. Em infecções mais velhas, pode-se observar pontos de coloração escura formados por escleródios e picnídios do patógeno (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 1997).

Fotografia 1 - Sintomas de *Macrophomina phaseolina* em caule (A) e vagens (B) de feijão.



Fonte: Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, 2005.

Fotografia 2- Picnídios de *Macrophomina phaseolina* visualizados em microscópio estereoscópico (A). Observação em microscópio óptico de picnídio e picnidiósporos de *Macrophomina phaseolina* (B).



Fonte: Bernardo de Almeida Halfeld-Vieira, 2005.

2.2.2 Podridão radicular de Rhizoctonia ou Tombamento (*Rhizoctonia solani*)

A Podridão radicular de rhizoctonia ou tombamento é causada pelo fungo *Rhizoctonia solani* Kühn, [teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donke] e tem grande importância devido a redução do estande das plantas, e em consequência diminuição significativa na produtividade final da cultura (VILARINHO et al., 2005).

No feijão os sintomas se apresentam como lesões deprimidas com bordos delimitados, de cor marrom-avermelhada. A sobrevivência do fungo se dá como escleródio ou como micélio em associação com restos culturais, após a colheita, e matéria orgânica no solo ou plantas hospedeiras perenes (GROSCH, et al, 2006).

A disseminação se dá por restos da cultura contaminados, através de sementes contaminadas, as quais servem de inóculo primário, ventos, chuva, irrigação, máquinas agrícolas e solo contaminado transportado para outros locais. A temperatura ideal para o desenvolvimento da doença é de 15 a 18° C, temperaturas superiores à 21° C reduzem significativamente o número de cancos ocasionados pelo fungo na cultura (BEDENDO, 2011).

A partir do desenvolvimento da doença, principalmente na parte basal do hipocótilo e raiz principal de plantas jovens, as lesões transformam-se em cancos avermelhados (KRAFT, 1993). Por se tratar de uma doença do grupo dois de McNew (MCNEW, 1960), plantas adultas são menos afetadas que plântulas (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 1997).

A infecção se dá a partir da penetração do patógeno através de injúrias, aberturas naturais, como estômatos e também pela cutícula intacta da planta (AGRIOS, 2005).

Fotografia 3 - Hifas de *Rhizoctonia solani* observadas a partir do microscópio.



Fonte: Rogério de Oliveira Marques, 2005.

2.2.4 Mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*)

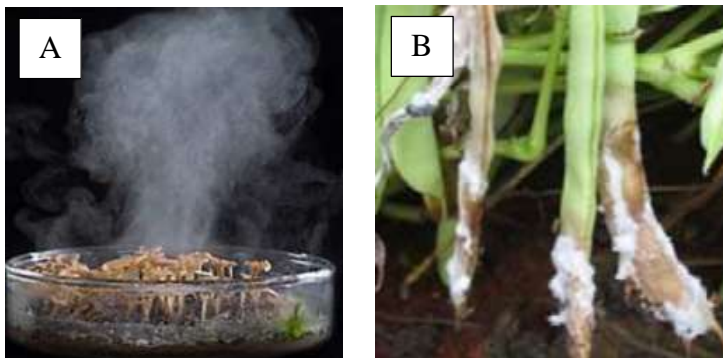
Por possuir mais de 300 espécies hospedeiras, o mofo branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, é uma doença de grande importância não só para a cultura do feijão, sendo capaz de causar perdas consideráveis na produtividade de diferentes culturas. Ocorre em diversos locais do mundo, principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (PAULA JR. & ZAMBOLIM, 2006).

Os sintomas da infecção pelo patógeno inicialmente aparecem como lesões pequenas e aquosas, as quais aumentam em tamanho rapidamente, tomando o órgão atacado pelo patógeno. As partes da planta infectadas pelo patógeno perdem a cor com o desenvolvimento da doença, passando a apresentar coloração amareladas e posteriormente marrons, acarretando em uma

podridão de aspecto mole nos tecidos infectados provocando a morte dos ramos e até mesmo da planta (BEDENDO, 2011).

A partir de condições favoráveis de umidade e temperatura, o micélio branco e cottonoso do fungo se desenvolve sob as lesões, podendo este sobreviver até três anos dormente em sementes infectadas. Quando a infecção torna-se severa, acarretando na morte de ramos e até mesmo da planta, pode-se observar o engrossamento do micélio do patógeno, apresentando a formação de escleródios, que podem sobreviver no solo de 5 a 8 anos. As condições ideais de temperatura variam de 11 a 20°C, sendo dias frios e úmidos ideais para o desenvolvimento da doença. Lavouras densas, umidade no solo e dias frios promovem o desenvolvimento e disseminação da doença, onde os apotécios (germinação dos escleródios) esporulam de cinco até 10 dias, disseminando o patógeno através do vento, restos culturais de plantas infectadas, sementes contaminadas e água de irrigação (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 1997).

Fotografia 4 – Apotécios de *Sclerotinia sclerotiorum* sendo ejetados pelos ascósporos (A). Sintomas e sinais de *Sclerotinia sclerotiorum* em vagens de feijão à direita.



Fonte: COBB & DILLARD, 2004. Fonte: LOBO JÚNIOR et al., 2009

2.3 PRINCIPAIS MÉTODOS DE CONTROLE DE DOENÇAS EM FEIJÃO

Alguns solos, devido as suas características físicas, químicas e biológicas, conseguem prevenir naturalmente o estabelecimento de patógenos ou inibir as suas atividades patogênicas, sendo que esse fenômeno é denominado de supressividade, e os solos que possuem essa característica são denominados de solos supressivos (BETTIOL et al., 2009). Porém, os agroecossistemas em geral, necessitam da atuação antrópica para o emprego de métodos de

controle que suplementam o potencial supressor de patógenos no sistema de cultivo (MADER et al., 2002).

Doenças de plantas podem ser definidas como a interação entre patógeno, o qual deve ser patogênico e virulento, ambiente, que deve ser favorável para o surgimento e estabelecimento de determinada doença, e hospedeiro, o qual deve ser suscetível, e ou em fase suscetível de desenvolvimento à infecção por determinado patógeno. Para obter o controle de doenças de plantas, é necessário que o triângulo, patógeno-ambiente-hospedeiro seja rompido em alguma de suas extremidades, onde algum dos fatores seja desfavorecido, como por exemplo modificação do ambiente, como: umidade, temperatura, luminosidade e época de semeadura, ou para que a fase em que a planta se encontra mais suscetível à determinado patógeno não coincida com o período mais favorável para o seu surgimento (AGRIOS, 1997).

Segundo os princípios de Whetzel 1925 e 1929, os métodos de controle de doenças de plantas podem ser agrupados em quatro princípios biológicos, sendo: exclusão, onde parte-se do princípio de prevenção da entrada de determinado patógeno em cultivos agrícolas ainda não infestados; erradicação, onde por meio de diferentes métodos de controle –químico, físico, biológico, cultural, genético- determinado patógeno é eliminado de uma área infestada; proteção, onde é introduzida uma barreira protetora entre a planta suscetível e o inóculo do patógeno; imunização, onde as plantas de interesse agrícola por meio de meios naturais, ou introdução de genes, tornam-se imunes, ou altamente resistentes à determinados patógenos, em uma área com grande infestação do patógeno em questão; e a terapia, a qual consiste no reestabelecimento da sanidade da planta, a qual já foi infectada por um determinado patógeno (BEDENDO, 1995).

São inúmeros os métodos que podem ser utilizados para o controle de patógenos que acometem a cultura do feijão, como físicos, químicos, culturais, além do controle genético e controle biológico, porém sua eficácia depende de quais práticas serão adotadas e principalmente da conciliação de diversos métodos de controle – manejo preconizado.

O Controle físico trata-se do controle de patógenos que acometem as plantas cultivadas através de métodos físicos para diminuição do inóculo inicial, no caso de emprego de temperaturas altas, e redução no desenvolvimento de patógenos, bem como diminuição da senescência do hospedeiro, e no caso de emprego de temperaturas baixas. No controle físico além do uso de diferentes temperaturas, e do emprego de radiações. Exemplos de controle físico

são: refrigeração de produtos armazenados; tratamento térmico de frutas e legumes; tratamento térmico de órgãos de propagação; tratamento térmico do solo a vapor; solarização do solo; eliminação de determinados comprimentos de onda; uso de radiação ultravioleta germicida; uso de radiação ionizante, e o armazenamento em atmosfera controlada ou modificada (BEDENDO, 2011).

Estudos realizados por Ambrósio et al., (2008) identificaram a associação da incorporação de matérias vegetais de mandioca com a solarização do solo, método de controle físico que visa utilizar o calor gerado pelos raios solares, associado a cobertura do solo com plástico de polietileno, no controle de fitopatógenos habitantes de solo, como *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*, objeto do presente estudo, obtendo controle total aos sete dias, demonstrando a eficiência do métodos de controle físico, bem como do emprego de métodos de controle associados.

O controle químico consiste na aplicação de produtos químicos, agrotóxicos a fim de controlar tanto patógenos de plantas cultivadas, quanto plantas indesejáveis e insetos nas culturas de interesse comercial. Seu uso teve início a partir da segunda guerra mundial, onde foi impulsionado devido à escassez de terras, onde não era possível realizar a rotação de culturas (KIMATI, 1995). Para o controle de patógenos que produzem estruturas de resistência no solo, são utilizados produtos químicos muito tóxicos (Lorentz et al., 2006), fumigantes, tendo inclusive muitos desses produtos como proibidos para utilização, como o brometo de metila (BESRI et al., 2010).

Vieira et al., (2001), estudaram quatro fungicidas no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* via água de irrigação nas doses recomendadas para a cultura do feijão, sendo eles: benomyln, iprodione, procimidone, e fluazinam, de acordo com as doses recomendadas, observando fluazinam o tratamento com os melhores resultados, tanto no controle do patógeno, como também no incremento da produção Kg/ha, sendo 2054 Kg/ha (fluazinam) e 1406 Kg/ha no tratamento testemunha.

Estudando os efeitos do controle químico utilizando de vinclozolin, fluazinan, tiofanato metílico, procymidone, benomyl, fluazinan e iprodione sobre *Sclerotinia sclerotiorum*, Costa e Costa (2004), observaram 100% da inibição das estipes e apotécios do patógeno quando aplicado vinclozolin. Fluazinan inibiu a formação de apotécios, e fluazinan e tiofanato metílico inibiram em 75% a germinação miceliogênica dos escleródios, seguidos de procymidone e

vinclozolin com 60%. Já benomyl, fluazinan e iprodione se apresentaram menos eficientes no controle do patógeno, resultados esses com porcentagem de controle semelhante aos resultados proporcionados pelo controle biológico e relatados na literatura em diversos trabalhos, alternativa à utilização de produtos muitas vezes tóxicos ao meio ambiente.

A prática da monocultura e utilização de modos de ação repetitivamente contribui para o aumento das doses de produtos empregados nas áreas cultivadas, contribuindo para que os fitopatógenos, pragas e plantas invasoras tornem-se resistentes à determinados produtos químicos, fazendo assim com que os mesmos tenham que ser usados em maiores concentrações, ou tornem-se até mesmo ineficientes.

Com o aumento do uso dos agrotóxicos, houve crescimento principalmente pelo interesse público, que esses alimentos produzidos a partir da aplicação de produtos químicos, fossem de qualidade e quantidade suficiente para suprir a demanda de consumo, já que os primeiros produtos da chamada revolução verde e seu pacote tecnológico, mais precisamente os organo-clorados, trouxeram prejuízos ao meio ambiente a longo prazo, devido a sua persistência por longos períodos; eram também lipossolúveis e acumulavam-se no organismo de animais, perpetuando na cadeia alimentar através dos processos de bioacumulação e biomagnificação, e também afetavam a reprodução de algumas espécies (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 1997).

Dentre os métodos de controle, o cultural é um dos métodos de menor impacto, por tratar-se de práticas associadas à outros controles usualmente utilizados, minimizando assim os danos causados por fitopatógenos de plantas cultivadas. Segundo Bedendo et al., (2011), as práticas adotadas no controle cultural, interferem basicamente na sobrevivência, na produção e disseminação do inóculo dos agentes causais de doenças.

Exemplos de práticas de controle cultural de doenças de plantas: rotação de culturas; uso de sementes, mudas e órgãos de propagação vegetativas de procedência e sadios; realização de “*rouging*”, a qual objetiva a eliminação de plantas doentes da cultura de interesse; eliminação de plantas voluntárias e hospedeiras alternativas; eliminação de restos culturais; preparo adequado de solo, visando às práticas conservacionistas; manutenção e incorporação de matéria orgânica ao solo; atentar à época de plantio e ao calendário de zoneamento de risco climático para as diferentes regiões, bem como as cultivares recomendadas; densidade de plantio adequadas para cada cultivar; irrigação e drenagem; nutrição mineral adequada,

atentando a análises de solo das áreas de interesse agrícola; pH do solo adequado; poda de limpeza da cultura; barreiras físicas; superfícies repelentes a vetores; práticas de desinfestação; semeadura em profundidade adequada e plantio na direção contrária ao vento predominante (BIANCHINI, MARINGONI e CARNEIRO, 1997).

Macena, Canteri e Ferreira Junior (2011), estudaram os efeitos do espaçamento e manejo de restos culturais para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro, observando que os espaçamentos de 40 cm e 60 cm entre linhas foram significativamente superiores a 20 cm para a redução do número de escleródios do patógeno. Napoleão et al., (2005) afirmam que os restos culturais podem agir como uma barreira física, dificultando a formação de apotécios e liberação de ascósporos de *Sclerotinia sclerotiorum*, justificando a importância de um manejo adequado para a diminuição do inóculo primário de diversos patógenos. Os danos causados pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* podem ser minimizados através do manejo empregado, assim como Nasser e Sutton (1993) observaram a redução do inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura do feijão, devido principalmente a barreira mecânica formada pela palhada da cultura anterior em plantio direto, reduzindo assim a liberação do inóculo no ambiente.

A supressão da população de *Rhizoctonia* spp. foi observada por Toledo-Souza et al., (2008), a partir da utilização de cultivos prévios de gramíneas, especialmente capim-mombaça (*Panicum maximum*) e braquiária (*Brachiaria brizantha*), também evidenciaram menores populações de patógenos habitantes de solo em plantios onde houve revolvimento do solo, sendo o fato da decomposição acelerada desses resíduos, pelo contato com microorganismos decompositores, o que não acontece sob o sistema plantio direto, onde a decomposição dos restos culturais se dá de forma lenta.

O controle genético é definido como o controle onde são introduzidos genes em plantas de interesse comercial e que são suscetíveis a determinados patógenos, para que as mesmas venham a desenvolver resistência, possibilitando o seu cultivo. A resistência atribuída a determinadas plantas pode ser qualitativa ou quantitativa. Na resistência qualitativa, o gene R é o responsável pelo controle atribuído, e de alguma forma identifica o patógeno. Já na resistência quantitativa, esta é controlada por determinados genes que atuam em diferentes etapas do reconhecimento, desde que o mesmo não tenha ocorrido anteriormente (BIANCHINI et al., 1997).

Garcia e Julliati (2012), estudaram o comportamento de duas cultivares de soja e 90 genótipos com plantas em diferentes estádios vegetativos (V1, V2, V3, V4 e R1) frente à *Sclerotinia sclerotiorum*, para determinar o estágio fenológico ideal, bem como o período de contato do patógeno com o tecido da planta para detecção da resistência parcial para inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum*, observando os estádios V1, V2 e V3 os ideais para inoculação do patógeno para avaliação de resistência, identificando 19 genótipos resistentes ou moderadamente resistentes quando realizados testes de folha destacada, e destes apenas dois comportaram-se como moderadamente resistentes quando realizadas inoculações do patógeno em plantas, demonstrando a agressividade do patógeno e necessidade de alternativas eficientes de controle.

Diante das dificuldades em encontrar métodos de controle físico, compatíveis com a cultura do feijão, as facilidades que alguns patógenos possuem de sobreviver no solo em restos culturais, bem como a dificuldade de se encontrar cultivares resistentes, e os problemas ocasionados pela utilização de fungicidas, como contaminação do ambiente e dos alimentos, busca-se como alternativa e efeito de controle, onde posiciona-se o controle biológico.

Além dos controles já utilizados usualmente, o controle biológico é apresentado pela literatura especializada como uma alternativa aos sistemas de cultivo agrícola, uma vez que visa à manutenção da população dos agentes biológicos nocivos aos patógenos presentes no solo. O controle biológico consiste na inserção de microorganismos capazes de agir de forma antagonista aos fitopatógenos da cultura, promovendo determinado grau de equilíbrio, diminuindo sua intensidade e população a níveis inferiores aos de danos econômicos, além disso, para um controle eficiente, os microorganismos devem possuir uma vida útil à longo prazo, e controle comprovado à condições de campo (MOKHTARNEJAD, et al., 2011).

2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

O controle biológico, vem ganhando destaque nos círculos de debates científicos, principalmente devido à inserção da Agroecologia nos debates acadêmicos. A Ciência Agroecológica ou Agroecologia, é entendida como um enfoque científico destinado a apoiar a transição dos atuais modelos de desenvolvimento rural e de agriculturas convencionais para estilos de desenvolvimento rural e de agriculturas sustentáveis (CAPORAL e COSTABEBER, 2004). A proposta agroecológica enfatiza agroecossistemas complexos nos quais as interações

ecológicas e os sinergismos entre seus componentes biológicos promovem os mecanismos para que os próprios sistemas subsidiem a fertilidade do solo, sua produtividade e sanidade dos cultivos (ALTIERI, 2012).

Segundo Bettiol (1991), microorganismos com potencial para o biocontrole de doenças de plantas são considerados ideais quando apresentam a combinação do maior número de características desejáveis, tais como: baixa frequência de mutações; capacidade de sobrevivência, persistência e multiplicação no ambiente; compatibilidade com agrotóxicos para que quando necessário a combinação dos dois controles, químico e biológico o mesmo ser viável; não ser patogênico ao homem; não ser virulento e fitopatogênico às plantas; resistência à altas e baixas temperaturas; fácil adaptação no agroecossistema ao qual será introduzido; boa capacidade de colonização e competitividade no ambiente, e por nutrientes com o patógeno; fácil cultivo, multiplicação e formulação; atuação em plantas hospedeiras e amplo espectro de ação, para controle de diversos fitopatógenos. A combinação dessas características é essencial e determinante para o sucesso do biocontrole de doenças.

Segundo Amorim et al, (2011), antibiose, competição e predação ou parasitismo são as principais interações antagônicas entre microrganismos. Além das três interações antagônicas entre microrganismos anteriormente citadas, a indução de resistência em plantas cultivadas também tem papel importante nos agentes de controle biológico.

A antibiose consiste na interação entre organismos, cujos quais secretam metabólitos capazes de prejudicar o desenvolvimento de determinados indivíduos de outra espécie, através de sua inibição. Os metabólitos secretados, oriundos da interação entre esses organismos, são conhecidos como antibióticos (AMORIM et al., 2011).

O controle por antibiose em patógenos que acometem a cultura do feijão já foram relatados na literatura, em que estudos *in vitro*, utilizando-se de fungos de origem endofítica não identificados, controlaram de 46,7% à 50% de controle de *Sclerotinia sclerotiorum* (ROCHA et al, 2009).

Da mesma forma Lucon & Correia, (2003), estudando isolados bacterianos oriundos de rizoplano de hortaliças para o controle de *Rhizoctonia solani* em pepino, encontrou resultados interessantes do ponto de vista do controle biológico, obtendo *in vivo* controle de até 100% da incidência do patógeno utilizando isolados ainda não identificados, demonstrando a eficiência de rizobactérias no biocontrole de doenças.

A competição é caracterizada pela capacidade de determinados microrganismos em competir pela ocupação dos locais de infecção do patógeno tanto por nichos ecológicos, quanto por nutrientes. Eles devem ser capazes de aumentar suas populações e se estabelecer de forma mais eficiente que o patógeno em questão, nos locais de infecção na planta (ROMEIRO, 2001).

No mecanismos de competição, bactérias com potencial para o biocontrole, quando em contato com a planta hospedeira aumentam a possibilidade de colonização do mesófilo da planta hospedeira, assim Halfeld-Vieira et al., (2015), constataram em seus estudos o controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflore* em maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) através da competição por compostos de ferro e nitrogênio nas folhas do hospedeiro.

O parasitismo consiste na relação nutricional entre dois organismos vivos, onde um obtém seu alimento através do outro, ou às custas do mesmo. Se tratando de um hospedeiro que seja um fitopatógeno, o parasita então é chamado de hiperparasita, pois parasita o parasita de uma planta. Existem diversos hiperparasitas capazes de parasitar patógenos habitantes do solo, como gênero do *Trichoderma*, que após detectar o patógeno habitante do solo (hospedeiro), através de um estímulo químico, se desenvolve em sua direção, produzindo quitinases, degradando assim sua parede celular. A partir daí o micélio do parasita se envolve na hifa do hospedeiro, formando apressórios que facilitam a sua adesão no parasita. Em seguida, o parasita produz diversas enzimas degradantes da parede celular do hospedeiro, penetrando no mesmo, chegando ao lúmen das células. Inúmeras proteínas são produzidas pelo parasita, o qual passa a se alimentar, destruindo o hospedeiro em questão (AMORIM et al., 2011).

Os mecanismos de indução de resistência podem ser divididos em passivos ou pré-existentes; estes quando a planta por sua vez já possui naturalmente barreiras histológicas ou componentes antimicrobianos presentes em seus tecidos, e ativos ou pós-infeccionais; são respostas da planta, que dependem exclusivamente de seu metabolismo para se tornarem eficazes (HUTCHESON, 1998). Com isso, o controle biológico é uma forma interessante de controle, e é objeto deste estudo.

De forma geral, a utilização de agentes para fins do controle biológico de doenças de plantas, é um importante segmento de pesquisa, seja pela seleção de antagonistas com elevado potencial de controle sobre o patógeno, como também na indução de resistência dos mesmos, apresentando-se como uma alternativa eficiente como demonstram inúmeros estudos já realizados e anteriormente citados, com controle semelhante ou até mesmo superior aos

alcançados através do controle químico. Sendo assim, o conhecimento dos mecanismos de ação proporcionados pelos agentes de biocontrole é de suma importância para a escolha das estratégias de manejo empregadas no controle dos patógenos que causam danos às culturas agrícolas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O trabalho foi conduzido nos laboratórios de Fitossanidade e de Microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), localizada no município de Cerro Largo, região noroeste do estado do Rio Grande do Sul (RS).

3.2 ISOLAMENTO DOS MICROORGANISMOS

As coletas à campo foram realizadas no município de Cerro Largo -RS, o qual está situado aproximadamente na latitude 28° 08' sul e longitude 54° 44' oeste, a 230 metros acima do nível médio do mar. O clima do local é caracterizado como Cfa, segundo classificação de Köppen.

Os isolamentos foram realizados a partir de coletas de solo rizosférico e de raízes de plantas cultivadas sadias de feijão, já implantadas na área. As plantas foram cultivadas em solo Latossolo Vermelho, e sob dois sistemas de cultivo distintos, convencional e de plantio direto. As amostras foram coletadas na área experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Cerro Largo, tendo como cultura antecessora trigo, onde o cultivo foi convencional.

A partir das análises de solo da área foram realizadas as adubações das duas áreas. Na área de sistema de plantio direto não consolidado, para o manejo da cultura utilizou-se de adubação química conforme recomendação, assim como controle de plantas invasoras. Também utilizou-se como planta de cobertura de solo a aveia (*Avena sativa*). Já no sistema convencional, foi utilizada adubação química para correção de fertilidade e produtos específicos para controle fitossanitário quando esses foram necessários.

As coletas de solo rizosférico e do rizoplano de plantas sadias de feijão foram realizadas no período de janeiro e fevereiro de 2016, em dois locais distintos e sob diferentes sistemas de cultivo, convencional e plantio direto.

Solo Rizosférico: Foram realizadas coletas de amostras em 20 pontos aleatórios da lavoura de feijão, amostras de solo da superfície e sob profundidade de 10 cm, utilizando-se de

espátula desinfetada. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel esterilizados e identificados.

Rizoplano e Raízes: Foram coletadas amostras de raízes de Feijão em 20 pontos aleatórios, na profundidade de 10 a 20 cm, onde ocorre dominância de absorção de nutrientes pelo sistema radicular de plantas de feijão, com a utilização de espátula desinfetada. As amostras foram acondicionadas em sacos de papel esterilizados e devidamente identificados.

As amostras foram levadas posteriormente ao laboratório de Fitossanidade e de Microbiologia da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo, onde foram conduzidas as avaliações.

As amostras de solo aderidas às raízes foram adicionadas, em ambiente asséptico a um Erlenmeyer, sendo 10 g de solo e 100 ml de solução salina (0,85% NaCl m/v) respectivamente. Para as amostras oriundas do conjunto rizoplano/endofítico, foram trituradas 10 g de raízes, adicionadas a 100 mL de solução salina (0,85% NaCl m/v). Para a solução salina, foram utilizadas 8,5g de NaCl em um litro de água destilada, sendo a solução homogeneizada e distribuída entre os tubos de ensaio e Erlenmeyer, e após esterilizadas em autoclave a 120° C por 15 minutos.

Após, com utilização de um agitador, os Erlenmeyer foram submetidos a agitação por 20 minutos em 200 rpm sob temperatura ambiente. Em seguida, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina estéril, onde 100 µL de cada uma das diluições foram inoculadas por espalhamento, com auxílio da alça de Drigalski, em triplicatas, em placas de Petri contendo meio Ágar Padrão Contagem, submetidas a incubação à temperatura de 25 °C por dois dias. Para o meio de cultura Ágar Padrão contagem, foram utilizadas 23 g de meio para um litro de água destilada, após os Erlenmeyer de 125 mL cada foram levados ao microondas por dois minutos, até que a solução atingisse ponto de cozimento, sendo então levadas à autoclave por 15 min sob temperatura de 120 °C.

Passado o período de incubação, foram realizadas observações das placas, com o objetivo de quantificar e posteriormente isolar as unidades formadoras de colônias (UFC), sendo observadas características morfológicas como brilho, bordo, coloração, elevação e tamanho. Após, foi realizada a contagem das bactérias contidas nas placas nas diferentes diluições, e as mesmas foram repicadas e identificadas com as siglas R para os isolados oriundos

do conjunto rizoplano/endofítico, e S para os isolados oriundos de solo rizosférico, com numerais nas placas de Petri contendo Ágar Padrão Contagem (PCA), e também foram feitas distinções entre os diferentes sistemas de cultivo, com as letras RC e SC para o sistema de plantio convencional, e RD e SD para o sistema de cultivo plantio direto, onde foram realizadas as coletas. Após a purificação dos isolados, os mesmos foram repassados para tubos e etiquetados com uma ficha contendo informações como coloração, características como brilho, tamanho, formato e bordos, e passaram a fazer parte da coleção do Laboratório de Manejo Integrado de Doenças da Universidade Federal da Fronteira Sul (LABMID-UFFS).

3.2.1 Produção de compostos antimicrobianos hidrossolúveis e voláteis

De todos os isolados, para verificar o potencial antagônico dos isolados bacterianos adquiridos através do isolamento de plantas de feijão de diferentes sistemas de cultivo, convencional e plantio direto, foi avaliado a capacidade destes em produzir compostos antimicrobianos hidrossolúveis e voláteis. Para isso os isolados foram confrontados com quatro patógenos de solo da cultura do feijão: *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*. Os patógenos da cultura do feijão utilizados nos ensaios fazem parte da coleção do Laboratório de Manejo Integrado de Doenças da Universidade Federal da Fronteira Sul, Campus Cerro Largo (LABMID UFFS) e foram cultivados em placas de Petri por sete dias à temperatura de 22°C em meio BDA (batata - dextrose - ágar).

Em placas de Petri, utilizou-se de meio BDA, onde os isolados bacterianos foram dispostos em riscas equidistantes, sendo quatro isolados diferentes em cada placa. O ensaio foi realizado, de modo que no centro das placas de Petri foram depositados, em cada placa, um disco de cinco mm de diâmetro, retirados dos bordos das placas cultivadas do patógeno por sete dias, contendo *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Macrophomia phaseolina*. As placas de Petri foram levadas à BOD, à 27° C, com fotoperíodo de 12 h escuro/12 h luz, a temperatura de 22° C durante sete dias, ou até que o disco depositado na placa contendo apenas meio BDA crescesse de modo a atingir os bordos das placas, as quais caracterizaram-se como o tratamento testemunha (MARIANO, 2005).

As avaliações foram feitas com o auxílio de um paquímetro digital, onde foram medidas os halos de inibição formados entre as colônias bacterianas e os patógenos.

Para os ensaios com o objetivo de observar a produção compostos antibióticos voláteis, utilizou-se de placas de Petri divididas, onde em ambos os lados utilizou-se meio Ágar nutriente e semeados os isolados bacterianos e os discos de 5 mm do patógeno. Após as placas foram fechadas e vedadas com papel filme. As testemunhas constituíram-se de placas contendo apenas os patógenos e o meio ágar nutriente, sem a presença dos isolados bacterianos, e para as testemunhas dos isolados bacterianos, o meio BDA não recebeu os discos de 5 mm do patógeno. As placas foram levadas a BOD, sob temperatura de 28° C, com fotoperíodo de 12 h escuro/12 h luz (MARIANO, 2005).

3.2.3 Biocaracterização dos isolados bacterianos

Para o teste para hidrólise de gelatina, ou hidrólise por enzimas proteolíticas, utilizou-se de meio gelatina a 15% em tubos verticais, onde os isolados bacterianos foram semeados com o auxílio de uma alça de platina reta, realizando um furo no centro do meio de cultura. Após os tubos foram acondicionados em BOD, sob temperatura de 25°C, e foram avaliados aos 4, 7 e 10 dias após o semeio, o controle constituiu-se de meio em tubos sem a presença do isolado bacteriano. As avaliações foram interpretadas de modo que se houvesse liquefação do meio, significou que a bactéria foi capaz de hidrolisar a gelatina (uma proteína), bem como o número de dias que a mesma necessitou para realizar a hidrólise (MARIANO, 2005).

Para o teste de hidrólise de caseína, utilizou-se de meio leite-ágar 4% em placas de Petri. Para o meio leite-ágar foram utilizados 50 mL de leite, para 125 mL de meio ágar. Após, os isolados bacterianos foram semeados ao meio, com auxílio da alça de platina, semeando 6 isolados bacterianos em cada placa de Petri em forma de risca. As placas foram invertidas e levadas a BOD, sob temperatura de 28,5° C durante 48 h. As avaliações foram realizadas de modo que os isolados os quais produziram halo transparente foi atribuído como isolados que hidrolisaram caseína.

Para o teste de hidrólise de amido, foi utilizado meio ágar amido. Os isolados bacterianos foram semeados em forma de riscas em placas de Petri, onde foram semeadas oito bactérias por placas devidamente identificadas. As placas foram acondicionadas em BOD por dois dias. Para observar a degradação do amido foi adicionado as placas solução de Lugol. Os isolados que degradaram o amido formaram um halo transparente (MARIANO, 2005).

Para o teste de hidrólise de lipídeos, foi utilizado o meio lecitina, o qual objetivou a visualização da produção de lectinases. Para tal os isolados bacterianos foram semeados em placas de Petri, contendo meio de cultura ágar padrão contagem (PCA), sendo adicionado solução de gema de ovo a 4%. Após as placas foram incubadas em BOD à 25° C, durante 7 dias, em ambiente escuro. As avaliações foram feitas a partir da presença ou não de halo de degradação opaco ao redor das colônias semeadas.

3.2.4 Produção de Sideróforos

A detecção da produção de sideróforos foi verificada através do método adaptado de Schwyn & Neilands (1987), onde em placas de Petri contendo cromoruzol agar assay (CAS), foram semeados os isolados bacterianos em pontos equidistantes, em 5 placas de Petri, onde cada placa constituiu-se de uma repetição, bem como o controle positivo (bactéria a qual se mostrou positiva em outros estudos, identificada como DFs912) e incubados à 27° C durante 5 dias. Posteriormente, foi observado a formação de halos alaranjados ao redor dos isolados positivos indicando a produção de sideróforos, estes foram medidos com um paquímetro digital.

3.2.5 Teste de motilidade

O teste de motilidade foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura ágar LB à 0,6%. As culturas obtidas foram acondicionadas em Emppendorf e lavadas em água duas vezes e posteriormente centrifugadas. Após foram pipetados 5 µL de cada suspensão bacteriana no centro das placas, cultivadas 24 horas antes. Posteriormente as placas foram incubadas por 24 horas em BOD sob temperatura de 27°C. A avaliação foi realizada com a utilização de um paquímetro digital, onde foram medidos os halos formados.

3.2.6 Produção de Amônia

Para a determinação de produção de amônia, os isolados bacterianos testados, foram cultivados em meio LB em 5 repetições, com uma testemunha contendo apenas meio de cultura,

em tubos de ensaio, contendo 10 mL de meio, durante 24 h. Após as 24 horas, 1 mL de solução meio e bactérias cultivadas foram repassados para novos tubos de ensaio e adicionados 0,1 mL de reagente Nessler. As avaliações foram feitas periodicamente, em período de 72 h, e foram consideradas produtoras de amônia, os isolados, cujos tubos das bactérias cultivadas quando adicionados reagente Nessler formaram um precipitado alaranjado ao fundo (MARIANO, 2005).

3.2.7 Produção de Lipopeptídeos surfactantes

Para a constatação da produção de lipopeptídeos surfactantes dos isolados, os mesmos foram cultivados em meio sólido 523 durante 24 h sob temperatura de 27°C. Após esse período, foram feitas raspagens dos isolados utilizando uma alça de platina, e os mesmos foram suspensos em água salina. Após, uma gota de 5 µL de cada suspensão bacteriana foi pipetada em parafilme em 5 repetições, e utilizou-se de água destilada como testemunha. As avaliações foram realizadas após 30 minutos e 1 hora para confirmação. As gotas da suspensão bacteriana que se espalharam no parafilme foram avaliadas como positivas, e as que se mantiveram iguais e ou semelhantes à testemunha, sem se espalhar, foram apontadas como negativas (MARIANO, 2005).

3.2.8 Detecção da atividade Lipolítica

Para detecção da atividade lipolítica, utilizou-se de meio àgar-tween 80 vertido em placas de Petri. Os isolados selecionados para a realização do ensaio, foram semeados nas placas correspondentes e levados a BOD sob temperatura de 27°C por 7 dias. As avaliações foram realizadas aos três e sete dias. Foram positivos os isolados que formaram um halo transparente opaco, formado por cristais de sabões de cálcio em torno de suas colônias bacterianas (MARIANO, 2005).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco repetições, onde cada placa de Petri constituiu-se de uma repetição. Para todos os ensaios realizados os resultados obtidos foram expressos em produção ou não de halo, caracterizando a utilização/produção ou não dos compostos testados, sendo estes descritivos. Para antibiose e compostos voláteis, utilizou-se de (+) quando a bactéria apresentou-se positiva a produção e (-) quando negativa. Para o teste de hidrólise de gelatina, quando a reação observada foi fraca, utilizou-se de (+), reação média (++) e reação forte (+++), hidrólise de lecitina, quando forte utilizou-se (+++), hidrólise de caseína e hidrólise de amido utilizou-se (+) quando positivo e (-) quando negativo. Para produção de amônia, sideróforos, motilidade bacteriana, e produção de lipopetídeos utilizou-se de (+) para positivo e (-) para negativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir das coletas realizadas, foram obtidos um total de 116 isolados, destes no sistema plantio convencional, foram isoladas 25 colônias bacterianas morfologicamente diferentes no solo rizosférico, e 33 tipos morfológicos diferentes no rizoplano. Sob sistema plantio direto, foram selecionadas 22 tipos morfolologicamente distintos na rizosfera, e 36 no conjunto rizoplano/endofítico.

Dos 116 isolados iniciais, cinco apresentaram antibiose por compostos hidrossolúveis para os três patógenos testados, *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, sendo eles os isolados com identificação RD27, RD31, RD34, SD18 e SC24 e quatro isolados apresentaram antibiose apenas para dois dos patógenos testados, sendo eles RD06, RD10, RD12 para os patógenos *M. phaseolina* e *R. solani*, e RD20 para *S. sclerotiorum* e *R. solani* (Tabela 1).

Tabela 1- Teste de antibiose dos isolados selecionados para *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Rhizoctonia solani*, realizados como parâmetro de *screening* inicial dos isolados adquiridos, para seleção dos isolados com potencial para o biocontrole.

Identificação	ANTIBIOSE		
	<i>Macrophomina Phaseolina</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
RD06	+	-	+
RD10	+	-	+
RD12	+	-	+
RD20	-	+	+
RD24	-	-	+
RD27	+	+	+
RD31	+	+	+
RD34	+	+	+
SD06	-	-	+
SD12	-	-	+
SD18	+	+	+
SD19	-	-	+
RC16	-	-	+
RC35	-	-	+
SC21	-	-	+
SC24	+	+	+
SC26	-	-	+

Existem diversos relatos na literatura de trabalhos utilizando bactérias como biocontroladoras de patógenos que acometem a cultura do feijão, como os realizados *in vitro* por Gupta et al. (2002) que evidenciaram o controle de *M. phaseolina* através de compostos hidrossolúveis, pela produção de algum antibiótico por bactérias do gênero *Pseudomonas* capazes de inibir o crescimento do fungo em até 76%, mostrando o potencial desse gênero no controle do patógeno objeto deste estudo.

Nechet et al. (2011) realizando ensaios *in vivo* buscando a inibição da germinação de escleródios em feijão, observaram controle de 33% a 96% para o patógeno *R. solani* utilizando de rizobactérias, assim como em ensaios realizados *in vivo* na cultura do tomate, onde Ahmadzadeh e Tehrani (2009) obtiveram o controle de *Sclerotinia rolfsii* e *R. solani* em 58,33 e 63,8% respectivamente, utilizando-se de isolados de *Pseudomonas* sp. Ludwig & Moura (2007), também relataram em seus estudos a utilização de bactérias de gêneros não identificados no controle de *R. solani* na cultura do arroz, onde testes *in vivo* evidenciaram de 88 a 91,7% de controle.

Melo et al. (1995), observaram também o potencial de bactérias do gênero *Bacillus subtilis* para o controle de doenças radiculares da cultura do feijão, como *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, e *Sclerotium rolfsii*. (MELO e VALARINI, 1998; MELO, 1995). Remuska et al. (2007), estudando o comportamento de *S. sclerotiorum* *in vitro* frente a *Bacillus thuringiensis* observaram a inibição do crescimento do fungo em 39,41%, percentual este considerado satisfatório, uma vez que este patógeno se comporta de forma agressiva e possui grande virulência.

Para o teste de produção de compostos voláteis (Tabela 2), apenas os isolados que apresentaram antibiose apresentados na Tabela 1, foram testados, sendo eles: RD34, RD27, SD18, RD06, RD10, RD12. Nos testes realizados para os patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclereotiorum* e *Rhizoctonia solani*, todos os isolados testados apresentaram-se como negativos, sendo o efeito causado por estes nos patógenos estudados provenientes de outro ou outros mecanismos de ação, como por exemplo a antibiose por compostos hidrossolúveis, a partir da produção de algum antibiótico. A produção de compostos voláteis por bactérias pode agir de modo que o composto volátil liberado adentre a parede celular fúngica, induzindo assim alterações principalmente em sua membrana plasmática (LI et al., 2012).

Tabela 2- Testes de compostos voláteis para os isolados que apresentaram os melhores resultados no teste de antibiose e de hidrólises, para o biocontrole de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Rhizoctonia solani*.

Identificação	Compostos Voláteis		
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Sclerotinia sclereotiorum</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
RD34	-	-	-
RD27	-	-	-
SD18	-	-	-
RD06	-	-	-
RD10	-	-	-
RD12	-	-	-

Para os testes de hidrólise de gelatina, hidrólise de caseína, hidrólise de lecitina e amido (Tabela 3), todos os 116 isolados foram testados. Para o teste de hidrólise de gelatina, aos quatro dias nenhum dos isolados apresentou hidrólise forte, aos sete dias, 14 dos 116 isolados apresentaram hidrólise forte (+++), e 25 dos 116 isolados apresentaram hidrólise média (++) . Aos 14 dias, 29 dos 116 isolados apresentaram hidrólise forte (+++).

Tabela 3- Testes de hidrólises, gelatina, caseína, lecitina e amido dos 116 isolados para o biocontrole de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Rhizoctonia solani*.

Identificação	Hidrólise de Gelatina			Hidrólise de Caseína	Hidrólise de Lecetina	Hidrólise de Amido
	4 dias	7 dias	14 dias			
RD01	+	++	++	+	-	+
RD02	+	+	+	+	-	+
RD03	+	+	+	+	-	-
RD04	+	+++	+++	+	-	+
RD05	+	++	++	+	-	-
RD06	+	+++	+++	+	-	+
RD07	-	-	-	+	-	+
RD08	+	++	++	+	-	+
RD09	-	+	+		-	+
RD10	-	++	+++	+	-	+
RD11	-	-	-	+	-	++

Continuação.

Identificação	Hidrólise de Gelatina			Hidrólise de Caseína	Hidrólise de Lecetina	Hidrólise de Amido
	4 dias	7 dias	14 dias			
RD12	+	+++	+++		-	-
RD14	+	+	+	+	-	+
RD15	+	++	++	+	-	+
RD16	+	+	++	+	-	+
RD17	+	++	++	-	-	-
RD18	+	+++	+++	+	-	-
RD19	+	++	+++		-	-
RD20	+	+++	+++	+	-	+
RD21	+	+++	+++	-	-	+
RD22	-	-	-	-	-	+
RD25	-	++	++	+	-	-
RD27	-	+	+	+	+++	+
RD28	-	-	-	+	-	-
RD30	+	+	+	+	+++	+
RD31	+	+++	+++	+	+++	-
RD32	-	+	++	+	+++	+
RD33	+	+	+	+	+++	-
RD34	+	++	+++	+	-	-
RD35	+	+	++	+	-	-
RD37	+	++	+++	+	-	+
SD01	+	++	+++	+	+++	-
SD02	+	+++	+++	+	+++	+
SD03	-	-	-	-	-	+
SD04	-	-	-	-	+++	+
SD05	-	-	-	-	-	+
SD06	+	++	+++	+	++	+
SD09	+	++	++	+	+	+
SD12	+	+++	+++	+	-	+
SD16	-	+	+	-	-	+
SD18	+	+++	+++	+	-	+
SD19	+	++	++	+	-	+
SD20	+	++	++	+	-	-
SD21	+	+++	+++	+	-	-
SD22	+	+++	+++	+	+++	+
SD23	+	+	+	+	+++	-
SD24	+	++	++	+	-	++
SD25	+	++	+++	+	+++	-
RC01	-	-	-	-	+++	-
RC02	+	++	++	+	-	+
RC05	-	-	-	-	-	++
RC06	-	-	-	-	-	++
RC08	-	-	-	-	-	++

Identificação	Hidrólise de Gelatina			Hidrólise de Caseína	Hidrólise de Lecetina	Hidrólise de Amido
	4 dias	7 dias	14 dias			
RC14	-	-	-	-	-	++
RC15	+	++	+++	+	-	+
RC16	+	+++	+++	+	++	+
RC20	-	-	-	-	-	+
RC21	-	+	+	-	+	++
RC24	-	-	-	+	-	++
RC28	-	-	-	-	-	+
RC30	-	-	-	-	-	++
RC32	-	-	-	+	-	-
RC33	+	+++	+++	+	-	+
RC34	+	++	+++	+	-	-
RC35	-	-	-	+	-	+
RC36	-	++	++	-	-	-
SC01	-	-	-	+	-	+
SC02	-	-	-	-	-	++
SC03	-	-	+++	+	-	+
SC04	+	++	+++	+	-	+
SC05	-	-	+	-	-	-
SC06	-	-	+	-	-	-
SC07	+	+	++	+	-	+
SC08	+	++	+++	+	-	-
SC10	-	-	-	-	-	+
SC13	+	++	++	+	-	-
SC14	-	-	-	+	-	++
SC16	-	-	-	+	-	+
SC18	+	+	++	+	-	-
SC21	+	++	+++	+	-	++
SC22	-	-	+	-	-	-
SC24	+	+++	+++	+	+	++
SC25	+	++	+++	+	-	-
SC26	+	++	++	+	-	+

*+ reação fraca para hidrólise
de gelatina

*++ reação média para
hidrólise de gelatina

*+++ reação forte para
hidrólise de gelatina

Para o teste de hidrólise de caseína (protease), 59 dos 116 isolados apresentaram-se hidrolíticas, sendo representados por (+). Para o teste de hidrólise de lecitina (fosfolipase) 12 dos 116 isolados testados apresentaram hidrólise forte (+++), dois apresentaram reação mediana

(++) e três hidrólise fraca (+). Para o teste de hidrólise de amido (amilase), dos 116 isolados 12 apresentaram reação mediana (++) e 43 hidrólise fraca (+).

De forma geral, os seis isolados positivos (+) para antibiose apresentaram a capacidade de hidrolisar, ou produzir algum composto que pode estar envolvido no controle biológico de doenças.

Hidrólise de gelatina (protease) apresentou-se positiva para os seis isolados selecionados, RD34, RD27, SD18, RD12, RD10 e RD06, hidrólise de caseína foi positiva para cinco dos seis isolados selecionados, sendo negativa apenas para RD12, hidrólise de lecitina foi positiva apenas para RD27 e hidrólise de amido apresentou-se positiva para os isolados RD27, RD10 e RD06. O isolado denominado RD27, foi o que apresentou-se positivo para os quatro ensaios de detecção de hidrólise.

Os seis isolados selecionados como potenciais biocontroladores se apresentaram positivos também para a produção de amônia (Tabela 4), variando apenas no número de horas para que a produção ocorresse, sendo a produção de amônia identificada às 48 horas de crescimento das bactérias testadas RD34, SD18, RD12, RD10 e RD06, exceto para RD27, a qual só pôde ser observada 72 horas após o cultivo. O tempo em horas para que a produção de amônia ocorra pode ser justificado pelo período necessário para que a bactéria atinja sua fase estacionária de crescimento, sendo esta variável entre espécies e gêneros (PELCZAR, 1996).

A produção de amônia por potenciais biocontroladoras torna-se importante para as plantas no sentido de que a mesma é liberada por alguns microorganismos em forma de metabólitos secundários, apresentando efeito tóxico sobre alguns fitopatógenos, devido a penetração direta nas membranas de suas células (MACAGNAN; ROMEIRO; POMELLA, 2009). Estudos realizados por Tenuta et al. (2002) relataram o efeito da amônia na redução de *Sclerotinia rolfsii*, pela penetração da amônia nas estruturas vegetativas do patógeno, podendo este ser um dos mecanismos de controle apresentado pelas potenciais biocontroladoras testadas.

Todos os seis isolados testados foram capazes de produzir sideróforos (Tabela 4), responsáveis por transportar e sequestrar Fe^{3+} (GLICK, 1999; AHMAD et al., 2008), mecanismo este associado tanto para a promoção de crescimento, quanto para o controle biológico de doenças de plantas, pela competição por ferro, como também pela produção de substâncias tóxicas, podendo explicar o comportamento dos isolados bacterianos em inibir o crescimento dos patógenos estudados quando cultivados em confronto direto, biocontroladora – patógeno.

Em relação a atividade lipolítica (Tabela 4), dos seis isolados testados, todos, exceto o isolado denominado SD18 apresentaram-se positivos. Microorganismos que apresentam atividade lipolítica são importantes devido a capacidade de ação de diferentes modos, como antifúngicos, antibióticos, antivirais, inseticida, etc. Além disso, são capazes de colonizar e competir por recursos no ambiente em que se encontram, estabelecendo relações simbióticas para a obtenção de nutrientes (RON & ROSENBERG, 2001; PACWA-PŁOCINICZAK et al, 2011).

Já no que diz respeito a produção de lipopeptídeos, dos seis isolados, RD34, RD27 e SD18 apresentaram-se positivos. A produção de lipopetídeos torna-se importante devido a capacidade de determinados microorganismos em reduzir consideravelmente a tensão superficial e interfacial entre o substrato e a célula bacteriana, isto se dá através da secreção de surfactantes, moléculas anfipáticas que permitem o espalhamento na superfície, podendo ser utilizado como alternativa ao uso de surfactantes sintéticos (KEARNS, 2010). Atualmente a maior parte dos lipopeptídeos relatados pertencem ao gênero *Bacillus*, responsável pela produção da surfactina considerado o mais importante já relatado (HUE; SEMNI; LAPREVOTE, 2001; ONAIZI; NASSER; TWAIQ, 2012).

A motilidade bacteriana de uma biocontroladora é um parâmetro importante do ponto de vista do controle biológico, pois indica que a mesma possui flagelos, os quais auxiliam na translocação bacteriana, promovendo uma vantagem de sobrevivência em diferentes ambientes, uma vez que pode facilitar a adaptação e colonização do hospedeiro (OTTEMANN et al. 1997). Para a capacidade de translocação dos isolados bacterianos testados em superfície, todas apresentaram-se positivos (Tabela 4).

Tabela 4- Avaliação da produção de sideróforos, amônia, motilidade e atividade lipolítica dos isolados selecionados para o biocontrole de *Macrophomina phaseolina*, *Sclerotinia sclerotiorum*, e *Rhizoctonia solani*.

Isolado	Amônia	Sideróforos	Motilidade	Atividade lipolítica
RD34	+	+	+	+
RD27	+	+	+	+
SD18	+	+	+	-
RD06	+	+	+	+
RD10	+	+	+	+
RD12	+	+	+	+

A busca por agentes que promovam o biocontrole de fitopatógenos que causam danos as culturas agrícolas têm mostrado diversos agentes responsáveis por diferentes mecanismos de ação dentre fungos (MOHAMED; HAGGAG, 2006) e bactérias (LANNA FILHO et al., 2010).

As bactérias podem apresentar atividades de biocontrole que englobam antagonismo, competição, e indução de resistência, destacando-se bactérias rizosféricas, também denominadas como promotoras de crescimento. Apesar dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* serem os mais estudados, também podem ser citados os gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous* e *Serratia* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; KUMAR et al., 2012). Sendo assim, as bactérias com potencial para o biocontrole das doenças estudadas da cultura do feijão podem fazer parte de algum dos gêneros já relatados na literatura como biocontroladoras eficientes.

De forma geral, as bactérias que apresentam potencial para o biocontrole de doenças de plantas podem ser uma alternativa eficiente a utilização de produtos químicos, capazes de agir de diferentes formas e sob diferentes mecanismos de ação.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dos 116 isolados selecionados inicialmente, seis isolados apresentaram resposta positiva à maioria dos ensaios realizados, sendo eles RD34, RD27, SD18, RD12, RD10 e RD06, provenientes de sistema plantio direto e cinco isolados de conjunto rizoplano/endofítico (RD), e um de rizosfera (SD).

Os testes realizados evidenciaram o potencial dos isolados selecionados para o controle biológico de doenças da cultura do feijão por diferentes mecanismos de ação, sendo eles: antibiose, competição e parasitismo.

A partir dos resultados encontrados e do estudo de quais compostos são produzidos ou hidrolisados pelas bactérias selecionadas, serão realizados testes *in vivo*, para determinação de seu potencial em condições de campo, se apresentam efeitos ou não em plantas, e quais efeitos, curativos ou preventivos, frente aos patógenos habitantes do solo estudados no presente trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5 ed. Flórida: Elsevier Academic Press, 2005.
- AGRIOS, G.N. Control of plant diseases. In: AGRIOS, G.N. **Plant pathology**. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- AHMAD, R.; M. ARSHAD, Z.A.; ZAHIR, M.; NAVEED, M. KHLAID & H.N. ASGHAR. Integrating N-enriched compost with biologically active substances for improving growth and yield of cereals. **Pak. J. Bot.**, 40(1): 283-293, 2008.
- AHMADZADEH, M.; TEHRANI, A.S. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control*, v. 48, p. 101-107, 2009.
- ALTIERI, M. **Agroecologia: Bases Científicas para Uma Agricultura Sustentável**. 3º Ed. Editora Expressão Popular: São Paulo, 2012.
- AMBRÓSIO, M. M. Q.; BUENO, C. J.; PADOVANI, C. R.; SOUZA, N. L. Controle de fitopatógenos do solo com materiais vegetais associados à solarização. *Summa Phytopathologica*, v. 34, n. 4, p. 354-358, 2008.
- ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; MORAES, S. M. D. Microrganismos associados às sementes de feijão caupi com ênfase à presença de *Macrophomina phaseolina*. Teresina: EMBRAPA, CPAMN. 8p. (EMBRAPA CPAMN. **Comunicado Técnico**, 88), 1998.
- BAKER, K.F. & COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco, **W.H. Freeman**, 433p, 1974.
- BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. & HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 22:641-649, 1998.
- BEDENDO, I. P. Murchas vasculares. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIM FILHO, A. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4.ed, v.1. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 451-458, 2011.
- BEDENDO, I.P. Classificação de doenças. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.805-809, 1995.
- BESRI, M.; MARCOTTE, M.; PIZANO, M.; PORTER, I. United Nations Environment Programme (UNEP) 2010 **Report of the Methyl Bromide Technical Options Committee**. 2010.

BETTIOL, W.; GHINI, R.; MARIANO, R. R. L.; MICHEREFF, S. J.; MATTOS, L. P. V.; ALVARADO, I. C. M.; PINTO, Z. V. Supressividade a Fitopatógenos Habitantes do Solo. In... Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. (editores) **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP: 2009.

BHATTACHARYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H., AMORIM, C., BERGAMIN FILHO, A., CAMARGO, L.E.A. & REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia. Doenças das Plantas Cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 3.ed. Cap.34 p. 380-382. 1997.

BRAUNACK, M.V., DEXTER, A.R. Soil aggregation in the seedbed: a review. I .Properties of aggregate sandbeds of aggregates. **Soil & Tillage Research**, Amsterdam, v.14, p.259-279, 1989.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. **Agroecologia: alguns conceitos e princípios**. Brasília: MDA/SAF/DATER-IICA, 24 p., 2004 _ Disponível em: <http://agroeco.org/socla/wp-content/uploads/2013/11/Agroecologia-Conceitos-e-principios1.pdf> _ acesso: 29/Jan/2016

CASTRO, J. L. de; FACHINI, C.; BARROS, V. L. N. P. de; RAMOS JUNIOR, E. U. O feijão no agronegócio brasileiro. In: SEMINÁRIO SARTORATO, A.; LOBO JÚNIOR, M.; Di STEFANO, J.G. Feijão: qualidade perdida. **Caderno Técnico Cultivar**, Pelotas, n.73, p.1-10, 2005.

COSTA, E. A.; GOEDERT, W. J.; SOUSA, D. M. G. Qualidade de solo submetido a sistemas de cultivo com preparo convencional e plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.41, n. 7, p. 1185-1191, julho 2006.

COSTA, G. R.; COSTA, J. L. da S. Efeito da aplicação de fungicidas no solo sobre a germinação carpogênica e miceliogênica de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**. 34 (3): 133-138, 2004.

CRUZ, J.C.; ALVARENGA, R. C.; FILHO, I. A. P.; SANTANA, D. P.; NOVOTNY, E. H.; KONZEN, E. A. Manejos de solo para a cultura do feijoeiro, **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p.42. 2004.

DEBOUCK, D. Sytematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (eds.) Common beans – **Research for crop improvement**. Cali, CAB International, CIAT, p. 55-118, 1993.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J. B. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***. Monografia - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 166 f. 1978.

DIDONET, A. D.; SILVA, C. S. Elementos climáticos e produtividade do feijoeiro, **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p.13-20. 2004.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Estresse de água e temperatura na cultura do feijão. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. (ed.) **Feijão irrigado: estratégias básicas de manejo**. Piracicaba: Publique, p. 155-169, 1999.

FAO. **Statistics Division 2012**. Disponível em: <www.faostat.fao.org>. Acesso em: 10 dez. 2015.

FERREIRA, A. C. B. de.; ANDRADE, M. J. B de.; ARAÚJO, G. A. A. de. Nutrição e adubação do feijoeiro, **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p.61. 2004.

GALLO, D. NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S. B.; VENDRAMINI, J.D., MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S. & OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Ed. FEALQ – Piracicaba, 920 p, 2002.

GARCIA, A. J.; JULLIATI, F. C. Avaliação da resistência da soja a *Sclerotinia sclerotiorum* em diferentes estádios fenológicos e períodos de exposição ao inóculo. **Trop. plant pathol.** vol.37 no.3 Brasília, 2012.

GLICK, B.R., C.L. PATTEN, G. HOLGUIN & D.M. PENROSE. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. **Imperial College Press**, London, UK, 1999.

GROSCH, R.; SCHERWINSKI, K.; LOTTMANN, J.; BERG, G. Fungal antagonists of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*: selection, control efficacy and influence on the indigenous microbial community. **Microbiol. Res.**, 110 pp. 1464-1474, 2006.

GUPTA, C.; DUBEY, R.; MAHESHWARI, D. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, Issue 6, pp 399–405, 2002.

HALFELD-VIEIRA, B.A.; SILVA, W.L.M.; SCHURT, D.A.; ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, G.R.; NECHET, K.L. Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. **Biological Control**, v. 80, p.40-49, 2015.

HUE, N.; SEMNI, L.; LAPREVOTE, O. Structural investigation of cyclic peptidolipids from *Bacillus subtilis* by high energy tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.

HUTCHESON, S.W. Currents concepts of active defense in plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 36: 59-90, 1998.

IBGE. **Censo agropecuário 2006: agricultura familiar - primeiros resultados**. Rio de Janeiro, 267 p., 2006.

IBGE. Indicadores IBGE, Estatística da produção Agrícola, janeiro de 2016. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201601.pdf>. Acesso em: novembro. 2016.

ITO, M.F.; CASTRO, J.L.; MENTEN, J.O.M.; MORAES, M.H. Importância do uso de sementes sadias de feijão e ou tratadas quimicamente. In: *Dia de Campo de Feijão*, 19, 2003,

Capão Bonito, SP. Anais... / Coordenadores Jairo Lopes de Castro; Margarida Fumiko Ito. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 37-49. (**Documentos IAC**, 71), 2003.

JÚNIOR, T. J. de P.; VIEIRA, R. F.; ZAMBOLINI, L. Manejo integrado de doenças do feijoeiro, **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 99. 2004.

KEARNS, D. B. A. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Review Microbiology**. V. 8, n. 9, p. 634-644, 2010.

KIMATI, H. Controle químico. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, p.761-785, 1995.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; DEVI, H.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from Rhizospheric soils for different plant growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2012.

LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. Qualidade nutricional. In: ARAÚJO, S.R. et al. **A cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFÓS, 786 p. p.22-70, 1996.

LANNA FILHO, R.; FERRO H. M.; PINHO, R. S. C. Controle Biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12, 2010.

LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; GUOQING, L.; HSING, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological Control** 61:113-120. 2012.

LORENTZ, R. H.; ÁRTICO, S.; Da SILVEIRA, A. B.; EINSFELD, A.; CORÇÃO, G. Evaluation of antimicrobial activity in *Paeni bacillus spp.* Strains isolated from natural environment, Lett. Appl. **Microbiol.**, 43, pp. 541-547, 2006.

LORENZI, H. Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional. 4. ed. Nova Odessa: **Plantarum**. 336 p., 1994.

LUCON, C. M. M.; CORREIA, C. C. Efeito de rizobactérias no controle de *Rhizoctonia solani* e na promoção de crescimento de plantas de pepino. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.70, suplemento 3, p.100-103, 2003.

LUDWIG, J. & MOURA, A.B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, p. 381-386. 2007.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO R.S. & POMELLA, A.W.V. Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos residentes de filoplano de cacaueteiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.140-142, 2009.

- MACENA, A. M. F.; CANTERI, M. G.; FERREIRA JUNIOR, J. P. Espaçamento e manejo de restos culturais para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.11, p.1871-1873, 2011.
- MADER, P.; FLIEBACK, A.; DUBOIS, D.; L. Gunst, P. Fried, U. Niggli. Soil fertility and biodiversity in organic farming, **Science**, 296, pp. 1694–1697, 2002.
- MANSOUR, A. T.; NIDA, A. I.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**. Volume 27, Issue 10, Pages 1354-1359, 2008.
- MAPA BRASIL. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <www.agricultura.gov.br >. Acesso em: 21 nov. 2015.
- MARIANO, R.L.R. & Silveira, E.B. (Coords.). **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. 2a . ed. Recife. UFRPE. pp.35-45, 2005.
- McNEW, G. L. The nature, origin and evolution of parasitism. P. 19-69. In J. G. Horsfall and A. E. Dimond (eds), **Plant Pathology**, an advanced treatise, II Academic Press Inc., New York, London, 1960.
- MELO, I. S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. (Eds.) **Controle Biológico**. v.1, Jaguariúna. SP. EMBRAPA. p. 17-67, 1998.
- MELO, I. S.; VALARINI, P. J. & FAULL, J. L. Controle Biológico de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**. v.20, p. 344, 1995.
- MELO, I. S.; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agrícola**, v. 52, p. 326-330, 1995.
- MELO, L. C; MELO, P. G. S; FARIA, L. C; et al. Interação com ambientes e estabilidade de genótipos de feijoeiro-comum na Região Centro-Sul do Brasil, **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 42, n.5, p.715-726, maio 2007.
- MENEZES, J. R. de. Manejo da cultura de feijão: enfoque sistêmico. In: SIMPÓSIO DA CULTURA DE FEIJÃO IRRIGADO, 4., Piracicaba, 2001. **Anais...** Piracicaba: ESALQ, Departamento de Produção Vegetal, p.35-42. 2001.
- MODA-CIRINO, V. Desafios ao controle de pragas na cultura do feijoeiro: Desafios na região Sul. In: SEMINÁRIO SOBRE PRAGAS E DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOERIO, 6., 2006, Campinas, **Palestras...**, Campinas SOBRE PRAGAS E DOENÇAS E PLANTAS DANINHAS DO FEIJOERIO, 6., 2006, Campinas, **Palestras...**, Campinas: Instituto Agrônômico, 2007.
- MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Journal Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 181-191, 2006.
- MOKHTARNEJAD, L; ETEBARIAN, H. R.; FAZELI, M.R.; JAMALIFAR, R. Evaluation of diferente formulations of potential biocontrol yeastisolates efficacy on apple blue mouldatstorage condition, Arco. **Phytopathol.**, 44, 2011.

NAPOLEÃO, R.L. et. Intensidade do mofo branco do feijoeiro em plantio convencional e direto sob diferentes lâminas d'água. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, n.4, p.374-379, 2005.

NASSER, L.C.B. & SUTTON, J.C. Palhada de arroz pode controlar doença do feijoeiro irrigado. **Cerrados, pesquisa e tecnologia**, v.1. 1993.

NECHET, K. de L.; DINIZ, I. S.; MARTINS, S. A.; SOUZA, G. R. de; HALFELD-VIEIRA, B. de A. Mecanismos de Ação de Rizobactérias do Feijão-Caupi Seleccionadas para Redução da Viabilidade de Escleródios de *Rhizoctonia solani*. **Separatas**, Embrapa Meio Ambiente, 2011.

ONAIZI, S.A.; NASSER, M.S.; TWAIQ, F.A. Micellization and interfacial behavior of a synthetic surfactant-biosurfactant mixture. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2012.

OTTEMANN, K.M. & MILLER, J.F. Roles for motility in bacterialhost interactions. **Molecular Microbiology**, 24: 1109–1117, 1997.

PACWA-PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G.A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z.; CAMEOTRA, S.S. Environmental applications of biosurfactantes: recent advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, p. 633-654, 2011.

PAULA JÚNIOR, T. J.; ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. (Ed.). **Feijão**. Viçosa: Editora UFV, p. 359-414, 2006.

PAULA JÚNIOR, T.J. de; VIEIRA, R.F; TEIXEIRA, H. et al. Informações técnicas para cultivo do feijoeiro–comum na região central brasileira 2007-2009. Belo Horizonte: Epamig, 180p. (**Epamig. Documentos, 42**), 2008.

PELCZAR Jr., J.M. Microbiologia: Conceitos e Aplicações, V. I e II, 2º ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* E *Trichoderma sp.* NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS. **UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, 13 (3): 31-36, 2007

ROCHA, R.; LUZ, D. E. da.; ENGELS, C.; PILLEGI, S. A. V.; FILHO, D. S. J de.; MATIELLO, R. R.; PILLEGI, M. Seleção de fungos endofíticos de confrei (*Symphytum officinale* L.), buscando controle biológico *in vitro* do fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). **Braz. J. Microbiol.** vol.40 no.1 São Paulo, 2009.

ROMEIRO, R.S. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: Romeiro, R.S. (Ed.) **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa. UFV. pp.87-96, 2001.

RON, E.Z. & ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v.3, p. 229-236, 2001.

SANDHU, A.; SINGH, R. D. Factors influencing susceptibility of cowpea to *Macrophomina phaseolina*. **Journal of Micology and Plant Pathology**, v. 29, n. 3, p. 421-424, 1999.

SANTOS, R. L. L. dos et al. Comportamento de cultivares de feijoeiro-comum em sistema convencional e plantio direto com diferentes palhadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 978-989, 2004.

SHORT, G. E., WYLLIE, T. D. Inoculum potential of *Macrophomina phaseolina*. **Phytopathology**, St Paul, v. 68, p.742-6, 1978.

SILVEIRA, P. M.; STONE, L. F. Requerimento de água. In: SILVEIRA, P. M.; STONE, L. F. (Eds). **Irrigação do feijoeiro**. Santo Antônio de Góias: Embrapa Arroz e Feijão, 230p. **Spectrometry**. v. 15, p. 203-209, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO / COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - **SBCS-CQFS**. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Porto Alegre, 400p, 2004.

TENUTA, M., CONN, K. L., & LAZAROVITS, G. Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology** 92:548-552, 2002.

TOLEDO-SOUZA, E. D de.; SILVEIRA, P. M. da.; JUNIOR, L. M.; FILHO, A. C. C. Sistemas de cultivo, sucessões de culturas, densidade do solo e sobrevivência de patógenos de solo. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.43, n.8, p.971-978, 2008.

VIEIRA, R.F., PAULA JÚNIOR, T.J. de, PERES, A.P. & MACHADO, J. da C. Fungicidas aplicados via água de irrigação no controle do mofo-branco no feijoeiro e incidência do patógeno na semente. **Fitopatologia Brasileira** 26:770-773. 2001.

VILARINHO, A. A., FREIRE FILHO, F.R., ROCHA, M.M., RIBEIRO, V.Q. & VILARINHO, L.B.O. Adaptabilidade e estabilidade de linhagens de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) de porte ereto em Roraima. **Anais...**, 3º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas, Gramado, RS. 2005.