

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA

SELEÇÃO DE BIOCONTROLADORES DE
Pseudomonas savastanoi pv. *glycinea* EM SOJA

FERNANDA DA SILVA VILASBÔAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia Área de Concentração – Fitopatologia.

Passo Fundo, abril de 2009.

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA
VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGRONOMIA

SELEÇÃO DE BIOCONTROLADORES DE
Pseudomonas savastanoi pv. glycinea EM SOJA

FERNANDA DA SILVA VILASBÔAS

Orientadora: Dra. Norimar D'Ávila Denardin

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UPF, para obtenção do título de Mestre em Agronomia Área de Concentração – Fitopatologia.

Passo Fundo, abril de 2009.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por iluminar e guiar meus passos, pela saúde, pela família,
pelas oportunidades.

Aos meus pais Gerson e Ana Lucia, ao meu irmão Ricardo, minha avó
Alice, tia Deja e tio Lauri, pelo apoio e incentivo.

Aos tios e primos que estiveram presentes e torcendo por mim.

À minha orientadora, Dra Norimar D'Ávila Denardin, pela amizade,
carinho, incentivo, dedicação e imensa sabedoria durante os trabalhos
realizados.

À Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária e ao Programa de
Pós-Graduação em Agronomia, Professores e Funcionários, pelo
auxílio e dedicação.

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida.

À pesquisadora da Embrapa Trigo Msc. Maria Imaculada P. M. Lima
pela amizade, incentivo e sabedoria.

Às minhas amigas de longa data Aliny B. Camargo, Ariane G. Nunes.

Aos colegas de Laboratório de Bacteriologia Vegetal,
Ana Trentin, Andréia Tumeleiro, Cheila Sbalcheiro, Camila Dias,
Eloise Gajardo, Fabiane Corrêa, Guilherme Dal Piaz, Marisséia.

Às colegas e amigas que ingressaram comigo Mirella Almeida e
Maria Fernanda da Cruz.

Ao pessoal do Laboratório de Micologia da FAMV-UPF, Cínara
Araújo, Paulo Tironi, Tiago Zanatta, Mateus Zanatta e Rosemari T. de
Souza.

Aos professores responsáveis pelo meu aprendizado e dedicação.

Professoras: Jurema Schons, Magali Grando, Sandra Brammer;

Professores: Carlos Alberto Forcelini e Erlei Melo Reis.

À secretária da PPGAgro Mari Vicelli pelo auxílio, paciência e bom humor, e disposição.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 A cultura da soja.....	15
2.1.1 Doenças da soja.....	17
2.1.1.1 Crestamento bacteriano da soja.....	18
2.2 Controle biológico.....	21
2.3 Microbiota do solo.....	27
2.3.1 Rizosfera.....	29
2.4 Bactérias associadas a plantas.....	30
CAPÍTULO I	
SELEÇÃO DE BIOCONTROLADORES COM AÇÃO	
ANTAGÔNICA A <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	35
RESUMO.....	35
ABSTRACT.....	36
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.1 Obtenção das bactérias antagonistas.....	39
2.1.1 Isolamento de bactérias a partir do solo e rizosfera.....	39
2.1.2 Isolamento de bactérias a partir de raízes, filoplano	
e sementes de plantas.....	40
2.2 Manutenção dos isolados.....	40

2.3 Origem da <i>Pseudomonas savastanoi</i> PV. <i>glycinea</i>	41
2.4 Bioensaio I: Avaliação massal <i>in vitro</i> contra <i>Psg</i>	41
2.5 Bioensaio II: Biocontrole <i>in vitro</i> de <i>Psg</i>	42
2.6 Bioensaio III: Espectro de ação de isolados antagonistas contra o fungo <i>Corynespora cassiicola</i>	42
2.6.1 Prospecção da atividade antagonística dos isolados contra <i>Corynespora cassiicola</i>	42
2.7 Análises estatísticas.....	43
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4 CONCLUSÕES.....	53
CAPÍTULO II	
AVALIAÇÃO FITOSSANITÁRIA DE SEMENTES DE SOJA MICROBIOLIZADAS COM BACTÉRIAS ANTAGONISTAS.	
RESUMO.....	54
ABSTRACT.....	54
1 INTRODUÇÃO.....	55
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1 Avaliação fitossanitária e fisiológica de sementes de soja tratadas e não tratadas com biocontroladores.....	57
2.1.1 Preparo das bactérias para microbiolização das sementes.....	57
2.2 Avaliação Fitossanitária e Fisiológica.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
4 CONCLUSÕES.....	66
CAPÍTULO III	
USO DE BACTÉRIAS NO CONTROLE DO CRESTAMENTO BACTERIANO DA SOJA.....	
RESUMO.....	67
ABSTRACT.....	67
1 INTRODUÇÃO.....	69
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	70

2.1 Preparo dos biocontroladores para microbiolização das sementes.....	70
2.2 Aplicação dos biocontroladores na parte aérea da planta.....	71
2.3 Instalação dos experimentos em casa-de-vegetação.....	72
2.4 Inoculação do patógeno.....	73
2.5 Avaliação.....	73
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4 CONCLUSÕES.....	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
CAPÍTULO I		
1	Isolados que foram testados contra a bactéria <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	44
2	Média de crescimento do fungo <i>Corynespora cassiicola</i> na presença de oito isolados de bactérias em relação a testemunha.....	49
3	Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos isolados UPF035 e UPF096.....	53
CAPÍTULO II		
1	Incidência (%) de fungos em sementes de soja cv. CD 214 RR.....	60
2	Incidência (%) de fungos em sementes de soja cv. BRS 244 RR.....	62
3	Percentagem de germinação das sementes de soja cv. CD 214 RR e BRS 244 RR.....	65
CAPÍTULO III		
1	Tamanho da lesão em mm em sementes de soja cv. CD 214 RR microbiolizadas com dois biocontroladores UPF035 e UPF096. e aplicação destes na parte aérea.....	75
2	Tamanho da lesão em mm em sementes de soja cv. BRS 244 RR microbiolizadas com dois biocontroladores UPF035 e UPF096. e aplicação destes na parte aérea.....	77

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
CAPÍTULO I		
1	Médias do crescimento dos isolados testados <i>in vitro</i> para antagonismo contra a <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv, <i>glycinea</i>	47
2	Médias de halos formados <i>in vitro</i> por isolados contra <i>Psg.</i>	48
CAPÍTULO II		
1	Porcentagem de controle dos isolados UPF035 e UPF096 na cv. CD 214 RR.....	61
2	Porcentagem de controle dos isolados UPF035 e UPF096 na cv. BRS 244 RR.....	63

SELEÇÃO DE BIOCONTROLADORES DE *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* EM SOJA

FERNANDA DA SILVA VILASBÔAS¹, NORIMAR D'ÁVILA DENARDIN²

RESUMO – O crestamento bacteriano, causado pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*), é uma das doenças mais importantes da soja. Apesar de ser mundialmente distribuída, é em regiões de clima temperado, com temperatura mais amena, que essa doença ocorre com maior frequência e severidade. Diferentes estratégias de controle podem ser utilizadas para o manejo do crestamento bacteriano, entre elas o emprego de agentes de controle biológico. Bactérias que colonizam endofítica ou epifiticamente diversas partes da planta podem ser utilizadas como agentes de biocontrole. Este trabalho teve como objetivo selecionar agentes de diversos hospedeiros e partes de plantas com potencial para biocontrole da *Psg*. Na seleção *in vitro*, 42 candidatos mostraram-se efetivos. Dois isolados (UPF035 e UPF096) também reduziram a incidência de diversos fungos transmitidos por sementes de soja. A aplicação dos biocontroladores, via semente ou aplicados via aérea, reduziu significativamente o tamanho das lesões e a intensidade do crestamento bacteriano da soja.

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra., professora da FAMV/PPGAgro/UPF - norimar@upf.br

Palavras chave: *Glycine max*, crestamento bacteriano, antagonistas, patologia de sementes, controle biológico.

SELECTION FOR BIOCONTROLERS OF *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* IN SOYBEANS

ABSTRACT – The bacterial blight, caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, is one of the most important diseases of soybeans worldwide. However, in temperate climate regions with mild temperatures this disease is more frequent and severe. Control of bacterial blight can be achieved through different control strategies, which may include the use of biocontrol agents such as endophytic and epiphytic bacteria. This research aimed to control *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* by means of control agents selected from different hosts and plant parts. The *in vitro* selection revealed 42 potential candidates. Two isolates (UPF035 and UPF096) also reduced incidence of various seed borne fungi. The use of biocontrolers through seed microbiolization or spray application reduced lesion size and intensity of bacterial blight on soybean plants.

Key-words: *Glycine max*, bacterial blight, seed pathology, antagonists, biological control.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a soja *Glycine max* L. (Merril) é considerada no Brasil, a cultura de maior expressão comercial, sendo a mais importante fonte de proteína vegetal, constituindo-se num componente fundamental na alimentação animal e com importância crescente na dieta humana.

Na safra 2007/2008, a produção de soja no país (segundo maior produtor do grão) foi de 60 milhões de toneladas com uma área cultivada de cerca de 21,3 milhões de hectares (CONAB, 2008).

Entre os principais fatores que limitam a obtenção de altos rendimentos em soja estão as doenças. Aproximadamente 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas no Brasil. Esse número continua aumentando com a expansão da soja para novas áreas e como consequência da monocultura.

A importância econômica de cada doença varia de ano para ano e de região para região, dependendo das condições climáticas de cada safra. Os danos anuais de produção por doenças são estimados em cerca de 15% a 20%, entretanto, algumas doenças podem ocasionar danos de quase 100%.

Dentre as doenças causadas por fitobactérias, destaca-se o crestamento bacteriano causado pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) (Coerper, 1919) Gardan et al., 1992.

Essa doença é comum nas regiões produtoras de soja, estando presente em toda a área cultivada. Entretanto, na região de clima temperado, onde a temperatura é mais amena, que essa doença ocorre

com maior frequência e maior severidade, tendo elevada capacidade de destruição foliar. Juntamente com outras doenças de final de ciclo os danos podem alcançar 40% (EMBRAPA, 2007).

Para o controle da bacteriose indica-se uso de cultivares resistentes, o uso de semente proveniente de lavoura indene isentas do patógeno, rotação de cultura (AGRIOS, 1997; ROMEIRO, 1995).

Na busca de alternativas para manejo de fitobactérias, visando sistemas agrícolas produtivos subsidiados por "boas práticas agrícolas", além do melhoramento genético clássico, investigações que se valem do manejo de microrganismos constituem estratégias promissoras, pois estes possuem ampla ação sobre o espectro de fitopatógenos.

A utilização de agentes de controle biológico insere-se no agronegócio através do controle de doenças de plantas, em substituição ou complementação dos pesticidas químicos no manejo integrado de doenças. Sua utilização pode aumentar a qualidade do produto agrícola reduzindo a poluição do meio ambiente, contribuindo para a preservação dos recursos naturais e aumentando a sustentabilidade dos agroecossistemas.

As plantas (raízes, caule, folhas, flores, frutos, etc.) constituem um dos substratos mais abundantes para o desenvolvimento de uma vasta gama de microrganismos correspondendo a superfície das folhas, ou filoplano à sua maior área colonizável. A espécie de planta e o ambiente físico/químico que a caracteriza condicionam as propriedades destas superfícies e, conseqüentemente, a diversidade e dimensão das populações de microrganismos que aí se desenvolvem (SILVA et al., 2006).

Diante desse cenário, a seleção de microrganismos com capacidade de biocontrole da bactéria, associada a estudos microbiológicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos da interação planta-patógeno, constitui demanda prudente e relevante.

Com isso, visando a possibilidade de controle do crescimento bacteriano, o presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias obtidas de diferentes nichos com potencial de biocontrole *in vitro* da *Psg*, bem como verificar o comportamento desses agentes potenciais através da microbiolização da semente e aplicação na parte aérea da planta contra a bactéria alvo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura da soja

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é uma planta herbácea pertencente à família Fabaceae (Leguminosa). Geralmente é anual e suas variedades podem ser classificadas, quanto à duração do ciclo vegetativo, em: precoces, semi-precoces e tardias. Esta planta é originária do sudoeste asiático, e há relatos de seu cultivo há mais de 6 mil ou 7 mil anos na China. Nos dias atuais, a soja, é uma das mais importantes leguminosas cultivadas no mundo (GOMES, 1990; AZEVEDO, 1993; BORÉM, 1999).

A soja cultivada atualmente é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagens, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas chineses (GOMES, 1990).

Nos Estados Unidos, a soja foi comercializada no século 20, a partir de então, houve um rápido crescimento na produção, com o desenvolvimento de cultivares comerciais (EMBRAPA, 2007).

O primeiro registro de cultivo de soja no Brasil data de 1914, no município de Santa Rosa, RS. Na primeira década do século 20, os estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo revezaram-se na produção da soja. Entretanto, a expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional (HASSE, 1996).

A importância dessa cultura se deve às suas inúmeras aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica. A aplicação primária do alimento de soja está na ração animal (97%). A principal fração utilizada pela indústria de alimentos está no processamento do óleo de soja, que é empregado em margarinas, gorduras, óleos para cozinha e salada. A lecitina, um fosfatídeo extraído do óleo da soja crua, é utilizado como emulsificante, lubrificante e agente estabilizador natural. O farelo de soja também é empregado em diversos produtos que simulam carne e leite. Existem poucas aplicações da soja não processada em alimentos, uma vez que ela naturalmente contém inibidores de tripsina que podem atuar como antinutrientes se a soja não for adequadamente aquecida durante o preparo. As utilidades industriais da soja variam desde a produção de levedo e anticorpos até a fabricação de sabões e desinfetantes (GOMES, 1990).

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, contribuindo com 38% do total de soja produzida, sendo superado apenas pelos Estados Unidos da América (CONAB, 2008). Na safra 2007/2008 a área cultivada de soja foi cerca de 21,31 milhões de hectares e a produção de cerca de 60 milhões de toneladas, representando mais de 20% do total de exportações dos produtos básicos do país com o envolvimento de cerca de US\$ 8 bilhões. ‘Os principais estados produtores no Brasil são Mato Grosso, Paraná e Rio Grande do Sul. O Brasil também se destaca por desenvolver cultivares de soja que apresentam eficiente relação simbiótica com a bactéria do gênero *Bradyrhizobium*, a qual realiza fixação biológica de N₂, sendo possível, a partir de então, obter uma economia anual de mais de US\$

2,5 bilhões com fertilizantes nitrogenados (ALVES & EL PONTE, 2003; EMBRAPA, 2007).

O desenvolvimento de novas tecnologias para o cultivo da soja, com intuito de promover incrementos sucessivos de produtividade, implica em constantes investigações. Produtividade de 5.000 kg ha⁻¹ tem sido obtida com frequência em trabalhos de pesquisa, podendo chegar a 8.000 kg ha⁻¹ (HUNGRIA et al., 2006). Contudo, raramente a produtividade ultrapassa a 4.000 kg ha⁻¹ em escala de lavoura, demonstrando que ainda há muito a ser feito na transformação de conhecimentos em tecnologias prontas para uso. O alcance desses novos patamares depende, dentre outros fatores limitantes, do manejo de doenças.

2.1.1 Doenças da soja

Entre os principais fatores limitantes à obtenção de elevados rendimentos dessa cultura, está a ocorrência de doenças, sendo que, cerca de 40 já foram identificadas no Brasil, abrangendo aquelas provocadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides (HENNING et al., 2005). A importância de cada uma delas varia com o ano, a região, as cultivares predominantes, a data de semeadura e as práticas agronômicas adotadas (SILVA et al., 2002). Os danos anuais de produção devido a doenças causadas por esses patógenos são estimados em cerca de 15 a 20%, mas algumas doenças podem ocasionar danos de até 100% (ALMEIDA et al., 2005, YORINORI, 2000). Dentre essas, encontram-se as doenças de final de ciclo, como o próprio nome diz, pode ocorrer a partir do enchimento de grãos,

causando desfolha acentuada, acarretando deficiência no enchimento de grãos, além de reduzir a qualidade e a germinação das sementes (EMBRAPA, 2007).

As principais doenças fúngicas de incidência na cultura da soja são: ferrugem (*Phakopsora pachirhizi*) Syd & P. Syd, antracnose (*Colletotrichum truncatum*) (Scwein.) Andrus & W. D. Moore, cancro da haste (*Diaphorte phaseolorum* (Cke. & Ell) f. sp. *meridionalis*), crestamento foliar e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*) (Tak. Matsumoto & Tomoy.) M.W. Gardner, mancha parda (*Septoria glycines*) Hemmi, mela ou requeima (*Rhizoctonia solani*), míldio (*Peronospora manchurica*) (Naumov) Syd, oídio (*Erysiphe diffusa*) (Cooke & Peck) U. Braun & S. Takamatsu entre outras (EMBRAPA, 2007).

Em relação às fitobacterioses, destacam-se o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, e a pústula bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Nakano) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings (HENNING et al., 2005).

2.1.1.1 Crestamento bacteriano da soja

Segundo Schaad et al. (2001), *Pseudomonas* compreende o gênero de bactérias Gram negativas, na forma de bastonetes retos ou curvos, móveis, com normalmente mais de um flagelo polar (lofótricas), aeróbicas estritas e reação de oxidase positiva e negativa. São capazes de produzir pigmentos fluorescentes em meios especiais.

O crestamento bacteriano é uma das doenças mais comuns, estando mundialmente distribuída. A doença é causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. É, porém, na região de clima temperado, onde a temperatura é mais amena, que essa doença ocorre com maior frequência e maior severidade, tendo elevada capacidade de destruição foliar. Os danos causados por essa doença podem variar de 5-40% segundo estudos realizados em outros países (DUNLEAVY et al., 1960; HARTMAN, 1999; SINCLAIR; BACKMAN, 1989 e HENNING et al., 2005). No entanto, não há estudos conclusivos sobre perdas e danos causados pela bactéria nos cultivares de soja do Brasil (EMBRAPA SOJA, 2007).

A infecção primária por essa bactéria pode ter origem em sementes infectadas, em resíduos culturais de safras anteriores ou mesmo no próprio solo. Transmissões secundárias, de plantas doentes para plantas saudáveis, são favorecidas por períodos úmidos e temperatura média entre 20 a 26 °C. Dias secos permitem que escamas finas de exsudato bacteriano se disseminem na lavoura, requerendo, contudo, um filme de água na superfície da folha para haver a infecção do patógeno (EMBRAPA SOJA, 2007).

No Brasil, a grande maioria dos cultivares é suscetível ao crestamento bacteriano, sendo já identificadas oito raças fisiológicas deste patógeno, R2, R3, R4, R6, R7, R10, R11 e R12, dentre os quais a R3 é a mais comum (EMBRAPA SOJA, 2007). Dentre os cultivares indicados para cultivo, observam-se diferentes níveis de infecção possivelmente devido à variabilidade climáticas associadas a diferenças específicas entre as raças da bactéria (ALMEIDA et al., 2005).

Os sintomas do crestamento bacteriano nas folhas surgem como pequenas manchas aquosas, de aparência translúcida, circundadas por um halo de coloração verde-amarelada. Essas manchas, com contornos angulares mais tarde, necrosam e coalescem, formando extensas áreas de tecido morto entre as nervuras secundárias. Na face inferior da folha, as manchas são de coloração quase negra, apresentando uma película brilhante na presença de umidade, formada pelo exsudato da bactéria. Infecções severas, nos estádios jovens da planta, conferem aparência enrugada às folhas (YORINORI, 2000; ALMEIDA et al., 2005; HENNING, 2005; EMBRAPA SOJA, 2007). Ataques severos causam rasgamento dos espaços internervais da folha e queda de folhas. Geralmente, a bacteriose é mais severa nos estádios que antecedem a floração, podendo causar até 20% de desfolha. Conforme Henning et al. (2005), esses sintomas são comuns nas folhas, mas pode ocorrer nas hastes, no pecíolo e nas vagens.

As principais fontes de inóculo são sementes e restos culturais infectados. A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), em região de clima temperado, sobrevive fora da estação de cultivo, tendo viabilidade de aproximadamente 16 meses em semente de soja (AGARWAL & SINCLAIR, 1997).

Na inexistência de cultivares resistentes a essa enfermidade, medidas de controle preventivo resumem-se ao uso de sementes livres do patógeno e adoção de rotação de culturas (ALMEIDA et al., 2005; EMBRAPA SOJA, 2007). Essas técnicas, entretanto, nem sempre são respeitadas, fundamentalmente, por aspectos de natureza econômica,

inferindo a necessidade de geração de tecnologia de controle alternativa.

Associadas às medidas preventivas, diferentes estratégias podem ser utilizadas para o controle de doenças, tais como o emprego de agentes de controle biológico e/ou de indução de resistência (CHEN et al., 2000; NANDAKUMAR et al., 2001; LABANCA, 2002).

O uso de microrganismos antagonistas a diferentes fitopatógenos, com ação direta sobre o patógeno e/ou ativando os mecanismos de defesa da planta, tem sido alternativa promissora no manejo de doenças de plantas. Esse tipo de microrganismo tem tido importante papel no controle de bactérias e de fungos fitopatogênicos, tanto utilizados isoladamente, por meio de pulverizações, como pela microbiolização de sementes como medida adicional aos tratamentos químicos (BEUX & DENARDIN, 2001; LUZ, 2001a; LUZ, 2001b; LUZ, 2003).

2.2 Controle biológico

O aumento dos custos do controle químico, e os problemas ocasionados por estes, como a poluição ambiental, a intoxicação do homem e animais, e o surgimento de patógenos resistentes a estes produtos indicam a necessidade de novas alternativas para o controle de fitopatógenos. Ressalta-se o controle biológico como alternativa para o manejo de fitobacterioses, este baseia-se em métodos ambientalmente corretos, não sendo nocivo para o homem e para os

animais, podendo fazer parte de um controle integrado de doenças (MELO, 1998).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como a redução da densidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais microrganismo (COOK; BAKER, 1983 apud ROMEIRO, 1995). Nessa definição, as atividades determinantes da doença envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras características do patógeno ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Os organismos incluem indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas e antagonistas (MARIANO et al., 2000).

O controle biológico de doenças de plantas tem sido usado de forma empírica desde a antiguidade (COOK; BAKER, 1983 apud ROMEIRO & GARCIA, 2003). Segundo esses autores, os egípcios já faziam uso dessa prática de modo intuitiva.

O uso de microrganismos procariotos para o controle de doenças de plantas de forma científica e direcionada iniciou-se apenas a algumas décadas. O mérito pode ser atribuído a pesquisadores chineses, que iniciaram trabalhos importantes nas décadas de 1950 e 1960 (ROMEIRO, 2005).

O primeiro trabalho documentado com a microbiolização de sementes foi desenvolvido por Novogradski et al. (1937), que diminuiu consideravelmente o ataque de *Fusarium* e de *Colletotrichum* em plântulas de linho. Esses autores usaram pela primeira vez o termo bacterização para denominar a técnica de incorporação de bactérias a sementes (LUZ, 1993).

Antagonista é um agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. O antagonista pode ter especificidade como no caso dos vírus atenuados utilizados para proteção cruzada ou serem ativos contra vários patógenos como algumas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (MARIANO et al., 2000).

Os mecanismos de biocontrole são as interações antagônicas através das quais os antagonistas ativamente expressam oposição aos patógenos e reduzem a ocorrência das doenças. Na maioria dos casos, os antagonistas são empregados com sucesso, como agentes de biocontrole sem conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos, os quais são de fundamental importância, quando se deseja empregar métodos racionais de melhoramento genético e aumentar a vantagem competitiva no ambiente (MELO, 1996).

Os mecanismos envolvidos no controle biológico são: parasitismo direto, predação, competição por nutrientes e nichos ecológicos, antibiose e produção de substâncias antibióticas e bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos, indução de resistências (ROMEIRO, 1995; MELO, 1998; SILVEIRA, 2000).

Segundo Menten (1996), o tratamento biológico é a incorporação artificial de agentes de controle biológico às sementes. As bactérias antagonistas são veiculadas à semente através de tratamento. O princípio básico do controle biológico é a ação exercida por determinados microrganismos que eliminam, impedem ou reduzem o desenvolvimento de patógenos transportados pela semente ou presentes no solo.

Em estudos realizados por Luz (2007), na cultura do trigo, em experimentos realizados em laboratório com a microbiolização, comparados com o controle químico iprodione + tiram, no tratamento de sementes contra os patógenos *Bipolaris sorokiniana* (incitador da mancha marrom, da podridão comum das raízes e da ponta preta dos grãos), *Pyricularia grisea* (incitador da brusone), *Drechslera tritici-repentis* (incitador da mancha amarela) e *Stagonospora nodorum* (indutor da mancha da gluma) obteve sucesso no controle biológico. Em cinco experimentos, a microbiolização das sementes mostrou uma eficiência superior em relação ao tratamento com fungicidas sintéticos, avaliando-se a percentagem de fungos nas sementes, em três experimentos, a eficiência foi equivalente e em dois experimentos, o tratamento químico foi superior ao tratamento microbiológico.

Yen et al. (2000), avaliaram o potencial de antagonismo de 127 isolados bacterianos, oriundos de plantas de feijão, beterraba e trigo contra o fungo *Uromyces appendiculatus* agente causal da ferrugem do feijoeiro. Esses agentes foram testados em casa-de-vegetação, onde foram aplicados na parte aérea das plantas de feijão, os isolados *Pantoea agglomerans* B1 e *Stenotrophomonas maltophilia* C3 reduziram significativamente a severidade da ferrugem do feijoeiro.

Com o objetivo de avaliar o efeito *in vitro* dos agentes antagonistas *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp, Remuska & Dalla-Pria (2007) testaram esses antagonistas *in vitro* contra oito fungos fitopatogênicos *Sclerotium rolfsii.*, *Diaporthe phaseolorum*, *Pythium aphanidermatum*, *Monilinia fructicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Bipolaris*

sorokiniana A bactéria *B. thuringiensis* mostrou-se eficaz como antagonista controlando a maioria dos fitopatógenos. A porcentagem de inibição de crescimento variou de 39,41 a 7,99 %, para *S.rolfsii* e *B. sorokiniana*, respectivamente.

Os gêneros mais estudados como agentes de controle biológico são *Bacillus* e *Pseudomonas*. Entretanto, um grande número de bactérias apresentam antagonismo contra vários tipos de fungos e bactérias patogênicas. Em batata (*Solanum tuberosum*) e trevo vermelho (*Trifolium pratense*) foram isoladas 25 espécies de bactérias endofíticas, de 18 gêneros, das quais 74% apresentaram *in vitro* antibiose ao fungo patogênico *R. solani* (STURZ et al., 1998). Em arroz, foram isoladas bactérias endofíticas que apresentaram evidente atividade antifúngica contra *R. solani*, *Pythium myriotylum*, *Gaïmannomyces graminis* e *Heterobasidium annosum* (MUKHOPADHAYAY et al., 1996).

Ferraz et al., (2008) avaliaram a rizobactéria *Bacillus cereus*, isolado UFV-101, previamente selecionada como agente de biocontrole, dispensada em plantas de tomate por quatro métodos diferentes: microbiolização de sementes, encharcamento do solo, exposição direta do sistema radicular e exposição de ferimentos e aberturas naturais. Visando verificar se outras formas de dispensa do agente de biocontrole são igualmente eficientes, realizaram o experimento em casa-de-vegetação, com a dispensa da bactéria em plantas de tomate da variedade ‘Santa Clara’, utilizando os diferentes métodos supracitados, posteriormente as plantas foram inoculadas com o patógeno desafiante *Corynespora cassicola*. Verificaram que a quantificação da doença indicou que a microbiolização de sementes é

o método mais eficiente e prático de dispensa do agente de controle biológico.

A produção do metabólito volátil ácido cianídrico (HCN) por PGPR além de ser um mecanismo de ação direta de promoção de crescimento de plantas, é considerado principalmente um mecanismo de biocontrole. Défago et al. (1990) apresentaram evidências de que o HCN é benéfico para o controle microbiológico, em estudos com a bactéria *P. fluorescens* e o fungo *Thielaviopsis* em fumo causando supressão da podridão preta nas raízes.

Nehl et al. (1996) verificaram que um isolado com alta produção de HCN, mutante construído a partir de *P. putida* BK8661, diminuiu os sintomas causados por *Septoria tritici* e *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* em trigo sob condições axênicas (LUZ, 1996).

A antibiose é a interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm um efeito negativo sobre o outro, inibindo a germinação e crescimento ou inativando a célula por toxicidade química. Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de outros organismos. Várias espécies de bactérias são conhecidas como sendo eficientes produtoras de antibióticos entre essas as dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, entre outros (MELO, 1998).

A competição envolve a interação entre dois ou mais organismos na disputa por nutrientes e por espaço, tanto na espermosfera quanto na rizosfera e filoplano. A competição por espaço se dá, principalmente, pela ocupação dos sítios de colonização

e a competição por nutrientes, pelos três elementos essenciais para a maioria dos patógenos: carbono, nitrogênio e ferro. A competição por carbono e por nitrogênio, aparentemente, pode ocorrer com todos os grupos de bactérias promotoras de crescimento de plantas. Entretanto, as bactérias do gênero *Pseudomonas* são os principais microrganismos que apresentam a competição pelo Fe^{+3} , realizada por sideróforos, como mecanismo de biocontrole de diversas doenças, como murcha vascular em cravo (*Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* W.C. Snyder & H.N. Hansen, 1940), tombamento de plântulas em algodão (*Pythium ultimum* Trow, 1901) e murcha do pepino (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* J.H. Owen, 1956) (MELO, 1998).

O parasitismo é a interação entre dois organismos, onde um dos organismos sobrevive às custas do outro, a espécie parasita produz enzimas líticas que degradam a parede celular dos hospedeiros. Pode ocorrer sobre estruturas vegetativas, reprodutivas e de sobrevivência, reduzindo a infecção e o inóculo do patógeno (LUZ, 1996).

A indução de resistência envolve a ativação de mecanismos de defesa latentes nas plantas em resposta ao tratamento com agentes bióticos e abióticos (KUHN et al., 2006). Os principais mecanismos de defesa exibidos pela planta após o contato com o indutor é a indução da resistência sistêmica (IRS), havendo aumento da produção de PR proteínas (proteínas relacionadas à patogênese), acúmulo de fitoalexinas, lignificação e estímulo da atividade da peroxidase. Os sinais podem ser etileno, ácido jasmínico, jasminatos e seus derivados, ácido salicílico, salicilatos e análogos. Esta ativação ocorre não apenas

no sítio de indução mas à distância, de forma mais ou menos generalizada (CHEN et al., 2000).

2.3 Microbiota do solo

Os microrganismos do solo, também chamados coletivamente de microbiota, são representados por cinco grandes grupos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários. Apesar de constituírem 1 a 4% do carbono total e ocuparem menos de 5% do espaço poroso do solo, a diversidade e a quantidade dos microrganismos é bastante elevada. No entanto, como o solo é normalmente um ambiente estressante, limitado por nutrientes, estima-se que somente 15% a 30% das bactérias e 10% dos fungos, encontram-se em estado ativo. Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana e as bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana do solo. De uma maneira geral, os microrganismos estão envolvidos em vários processos de grande interesse agrônômico, particularmente no que se refere à agricultura orgânica e à rotação de culturas. Destacam-se os processos de decomposição e ressíntese da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, as transformações bioquímicas específicas (nitrificação, desnitrificação, oxidação e redução do enxofre), fixação biológica do nitrogênio, a ação antagônica aos patógenos, produção de substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento, entre outros (ANDREOLA & FERNANDES, 2007).

2.3.1 Rizosfera

A rizosfera, palavra de origem grega criada a partir dos termos “rizho” e “sphaera”, expressa o volume do solo influenciado pela raiz, até a distância de 1 a 5 mm. Inicialmente denominada por Hiltner (1904), a rizosfera favorece intensamente a atividade microbiana pela diversidade de compostos orgânicos, ricos em açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e outros, presentes nos exudatos secreções, mucilagens e mucigel (SIQUEIRA et al., 1994). Devido à disponibilidade de substratos, *Pseudomonas* e *Bacillus* podem apresentar tempo de geração 15 a 2,5 vezes, respectivamente maiores na rizosfera do que em solo não rizosférico. Para que certos microrganismos possam se estabelecer em um ambiente como a rizosfera, além da capacidade rápida de multiplicação e diversidade metabólica, a capacidade de produzir substâncias antagônicas pode favorecer certos grupos de rizobactérias durante o processo de colonização radicular (ROMEIRO & GARCIA, 2003; LUZ, 1996).

Rizobactérias são bactérias que habitam a rizosfera e, ou o rizoplano de plantas, onde se multiplicam, sobrevivem e se protegem da ação antagonista do restante da microbiota do solo. (ROMEIRO, 2005).

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) constituem um grupo muito amplo de microrganismos, uma vez que sob essa designação incluem-se quaisquer bactérias que vivam na rizosfera e afetem beneficemente o crescimento de uma ou mais espécies vegetais (FREITAS, 2007). Segundo Bashuan & Holguin, (1998), as rizobactérias estão divididas em dois grupos

PGPR “plant growth-promoting bacteria” para designar bactérias que promovem o crescimento de plantas, proporcionando efeitos benéficos para as plantas, e Biocontrol-PGPR para designar rizobactérias que promovem controle biológico através da produção de alguma substância ou estimulando as defesas da planta.

A família *Rhizobiaceae* é a mais explorada para promoção de crescimento vegetal. Entretanto, outras famílias de bactérias têm apresentado importante ação na promoção de crescimento vegetal.

Neste contexto, Sturz (1995) verificou que as bactérias endofíticas dos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium*, *Actinomyces* e *Acinetobacter* interagem com a planta hospedeira durante o processo de crescimento e tuberização da batata, evidenciando que grupos filogeneticamente distintos, podem atuar nestes processos.

Num outro trabalho realizado por Sturz et al. (1997). foram caracterizadas bactérias endofíticas (não rizobiais) isoladas de nódulos de trevo vermelho. Estas bactérias promoveram o crescimento e desenvolvimento de plântulas do hospedeiro quando inoculadas isoladamente ou em combinação com o *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolli*, indicando que a promoção de crescimento vegetal é influenciada por outras bactérias que não pertencem ao grupo dos rizóbios.

2.4 Bactérias associadas a plantas

As plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano. Nestas plantas hospedeiras, diferentes nichos são ocupados pelos

microrganismos, tais como as superfícies das raízes e folhas (as epífitas), ou então, estas colonizam o interior de diversos tecidos das plantas (endofíticas). As bactérias que vivem no interior das plantas podem ser divididas em dois grupos, com base na sua relação com o hospedeiro (SOBRAL, 2003). O primeiro grupo é o das bactérias endofíticas que são geralmente definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis (HALLMANN et al., 1997). Esse conceito as diferencia do outro grupo de bactérias que, apesar de também viver no interior da planta podem causar doença, trazendo prejuízo ao seu hospedeiro. Pode-se afirmar que as diferenças entre bactérias endofíticas, epifíticas e fitopatogênicas são apenas de natureza didática, não existindo um limite claro entre grupos e sim um gradiente entre eles, pois existem algumas populações bacterianas que podem flutuar entre a colonização endofítica e epifítica. Dependendo das condições ambientais ou equilíbrio com outros endófitos, uma bactéria endofítica pode tornar-se um patógeno e uma bactéria epifítica pode, eventualmente, entrar numa planta e lá permanecer endofítica ou causando danos as mesmas (ANDREWS & HARRIS, 2000; SABARATNAM & BEATTIE, 2003; KLOEPPER et al., 1992).

Bactérias endofíticas e epifíticas podem contribuir para o crescimento, a sanidade e o desenvolvimento vegetal. A promoção de crescimento vegetal pode ser resultante tanto de ações diretas como controle biológico por competição de nutrientes, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN LOON et al., 1998) como de ações diretas, como disponibilização de nutrientes para a

planta, fixação de nitrogênio atmosférico e a produção de reguladores de crescimento vegetal (SILVEIRA, 2003).

De acordo com a fonte CNPMA (2006), muitos benefícios têm sido atribuídos aos microrganismos endofíticos como a capacidade de alguns em produzir antibióticos e serem utilizados como agentes de controle biológico de pragas. Assim, o método biológico é uma medida de controle promissora, que deve ser pesquisada, contra os principais patógenos das culturas.

Sabe-se que bactérias e fungos podem viver endofiticamente em diferentes partes das plantas como raízes, ramos, folhas, sementes, frutos, tubérculos e mesmo flores, colonizando espaços intracelulares, vasos do xilema ou mesmo apresentando colonização intracelular, em diversas culturas como milho, algodão, tomate, batata, cana-de-açúcar, citros e videira dentre outras (SILVA et al., 2006).

Os microrganismos endofíticos possuem uma grande vantagem ao colonizar as plantas, pois os tecidos internos proporcionam um ambiente protegido das adversidades do meio, como raios ultravioleta, chuvas e flutuações de temperatura, bem como, maior disponibilidade de nutrientes, evitando assim competição com outros microrganismos como a microbiota rizosférica. Logo, endofitismo pode ser visto como uma forma evolutiva para sobrevivência desses microrganismos (SILVA et al., 2006).

Dessa íntima associação, muitas vezes mutualística, levantou-se a hipótese de que os endófitas podem exercer efeitos benéficos nos seus hospedeiros, como a promoção de crescimento e o controle de patógenos.

Os microrganismos epifíticos, habitantes das superfícies dos órgãos das plantas, agem como tampão biológico, prevenindo o patógeno de infectar o hospedeiro, por este fato conclui-se que o controle biológico ocorre naturalmente (BETTIOL, 1991).

Os microrganismos antagonicos do filoplano consistem basicamente de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. No filoplano são intensas as competições por nutrientes, a antibiose, o parasitismo, resultando num controle biológico natural. Segundo Leben (1965) citado por Bettiol (1991), a microflora epifítica é composta por microrganismos residentes, transeuntes ou casuais, ou seja, estão na planta por acaso. Os microrganismos residentes se multiplicam na superfície foliar sem afetar o hospedeiro. Organismos fitopatogênicos, antes de penetrarem no hospedeiro, comumente estão transeuntes no filoplano, neste período são expostos às interações com microrganismos epifíticos.

Os exudatos foliares assim como materiais depositados sobre as folhas e liberados pelos próprios microrganismos do filoplano, são fontes de nutrientes para os microrganismos epifíticos e saprofiticos do filoplano. O tipo, a idade da planta e fatores como luz, temperatura, água da chuva, injúrias e adubação, interferem nos exudatos foliares. Como materiais depositados destacam-se grãos de pólen, secreção de afídios e restos orgânicos, como principais fontes de nutrientes para os microrganismos epifíticos (GRIGOLETTI JR et al., 2000).

A seleção de microrganismos antagonicos em programas de controle biológico constitui a base fundamental de estudos, os quais podem vir a determinar o sucesso da implantação da cultura. Todos os métodos de seleção de agentes de biocontrole são baseados em

evidências de que o organismo candidato interfere de algum modo, no desenvolvimento do patógeno ou reduz a doença, sendo que a interferência implica em algumas formas de inibição, podendo ser avaliada tanto *in vitro* como *in vivo* (MARIANO, 1993).

CAPÍTULO I
SELEÇÃO DE BIOCONTROLADORES COM AÇÃO
ANTAGÔNICA A *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

FERNANDA DA SILVA VILASBÔAS¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN²

RESUMO - Dentre as doenças causadas por bactérias na cultura da soja pode-se destacar o crestamento bacteriano causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*), devido à disseminação por semente, permanência nos restos culturais e dificuldade de controle. Objetivando a obtenção de bactérias com potencial de biocontrole para o crestamento bacteriano da cultura de soja, procedeu-se o isolamento de bactérias da rizosfera, rizoplano e filoplano de plantas cultivadas como abacaxi, cana-de-açúcar, milho, tomateiro, espécies nativas, espécies forrageiras e essências como arruda, de solo cultivados e de campo nativo. Foram obtidas 73 isolados da raiz, 15 isolados de sementes, 46 isolados do filoplano, 68 isolados de solo, totalizando 202 isolados. Para a prospecção da potencialidade antagonística dos possíveis agentes de biocontrole foram efetuados testes *in vitro*. Dos 202 isolados, 42 isolados apresentaram potencial contra a bactéria *Psg*, sendo que 33 isolados cresceram rapidamente cobrindo a bactéria fitopatogênica e 9 isolados formaram halo de inibição contra *Psg*.

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra., professora da FAMV/PPGAgro/UPF - norimar@upf.br

Palavras-chave: Crestamento bacteriano, antibiose, controle biológico.

**SELECTION OF BIOCONTROLERS WITH ANTAGONISM
TO *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea***

ABSTRACT - Among the diseases caused by bacteria on soybeans, the bacterial blight caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) is one of the most important due to its spread by seed, survival in crop residues and difficulty of control. In a search for biocontrol agents to *Psg*, several bacteria were isolated from rhizosphere, rhizoplane, and phylloplane of pineapple, sugar-cane, maize, tomato, and native and forage species, as well as from native and cultivated soils. There were 73 isolates from roots, 14 from seeds, 45 from phylloplane, and 68 from soil being tested *in vitro*. A total of 42 isolates showed potential against *Psg*, of which 33 grew rapidly over *Psg* colonies and nine formed a halo of inhibition against *Psg*.

Key-words: bacterial blight, antibiosis, biological control.

1 INTRODUÇÃO

O aumento dos custos do controle químico, e os problemas ocasionados por este, como a poluição ambiental, a intoxicação do homem e animais, e o surgimento de patógenos resistentes a estes produtos indicam a necessidade de novas alternativas para o controle de fitopatógenos. Dentre essas pode-se destacar o controle biológico,

que baseia-se em métodos ambientalmente corretos, não sendo nocivo para o homem e para os animais, podendo fazer parte de um programa de controle integrado de doenças (MELO, 1998).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser definido como a redução da quantidade de inóculo ou das atividades determinantes da doença, através de um ou mais microrganismos. Os mecanismos envolvidos são: parasitismo direto, predação, competição por nutrientes e nichos ecológicos, antibiose produção de substâncias antibióticas e bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos, pelo estímulo do hospedeiro por microrganismos não necessariamente antagônicos, ativando mecanismos de resistências antagonistas (ROMEIRO, 1995).

Os mecanismos de biocontrole são as interações antagônicas através das quais os antagonistas ativamente expressam oposição aos patógenos e reduzem a ocorrência das doenças. Na maioria dos casos, os antagonistas são empregados com sucesso, como agentes de biocontrole sem, no entanto, haver o conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos, os quais são de fundamental importância, quando se deseja empregar métodos racionais de melhoramento genético e aumentar a vantagem competitiva no ambiente (MELO, 1998).

As plantas (raízes, caule, folhas, flores, frutos, etc.) constituem um dos substratos mais abundantes para o desenvolvimento de uma vasta gama de microrganismos correspondendo a superfície das folhas, ou filoplano, à sua maior área colonizável. A espécie de planta e o ambiente físico/químico que a caracteriza condicionam as propriedades destas superfícies e, conseqüentemente, a diversidade e

dimensão das populações de microrganismos que aí se desenvolvem (SILVA et al., 2006).

A rizosfera é a região onde o solo e as raízes das plantas entram em contato. O número de microrganismos na raiz e à sua volta é muito maior do que no solo livre, resultando em população diversificada nessa região (PELCZAR JR et al., 1997).

Endofíticos são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais, em parte ou durante todo o seu ciclo de vida, sem causar danos aparentes a seu hospedeiro, enquanto que os microrganismos epifíticos são aqueles que habitam a superfície do vegetal (GRIGOLETTI JR. et al., 2000).

O ambiente do filoplano é bastante diferente do solo, pois sofre variações mais rápidas e intensas tanto da temperatura como da umidade. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são comumente encontrados em folhas. Como regra geral, no início do desenvolvimento das folhas, as bactérias são as colonizadoras mais freqüentes (GRIGOLETTI JR. et al., 2000).

Para iniciar um programa de controle biológico, torna-se necessário efetuar a seleção de microrganismos *in vitro* ou *in vivo*, sendo o primeiro mais utilizado quando se testam grandes populações (MARIANO, 1993).

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de microrganismos de sementes, raízes, rizoplano e filoplano de diferentes espécies vegetais a fim de obter-se candidatos com potencial antagonístico *in vitro* contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das bactérias antagonistas

Os isolados foram obtidos do solo (cultivado e nativo), da rizosfera, das raízes e do filoplano de plantas cultivadas como abacaxi, cana-de-açúcar, milho, soja, tomateiro, espécies nativas, espécies forrageiras e essências como arruda. Também foram isoladas bactérias presentes em sementes. Todos os isolados são de origem da Região do Planalto Médio, RS.

2.1.1 Isolamento de bactérias a partir do solo e rizosfera

Suspensões foram preparadas com 10 g de solo adicionados a 90 mL de solução fisiológica (NaCl 0.85) contendo 0,01 mL de Tween 20, sendo agitados por 10 minutos. A partir das suspensões obtidas, foram realizadas diluições seriadas, das quais foram utilizadas os fatores 10^{-3} e 10^{-4} (MARIANO, 2000). De cada diluição, utilizaram-se 100 μ L que foram semeados em placas de Petri, contendo o meio 523 de Kado & Heskett (1970), Caseína-dextrose-ágar (CDA) e meio de extrato de solo-ágar (PRAMER & SCHIMIDT, 1964).

2.1.2 Isolamento de bactérias a partir de raízes, filoplano e sementes de plantas

O isolamento dos candidatos a antagonistas foi realizado a partir de raízes e filoplano (parte aérea) de plantas cultivadas como abacaxi, cana-de-açúcar, milho, tomateiro, espécies nativas, espécies forrageiras e essências como arruda, bem como, de sementes de forrageiras, soja, algodão, melão, cevada e trigo.

Porções de diferentes partes de tecido vegetal da planta (folhas e raízes) foram retiradas, desinfestadas e maceradas com 5 mL de solução fisiológica (NaCl 0.85) contendo 0,01 mL de Tween 20 em cadinho de porcelana esterilizado. A seguir, foram retiradas alíquotas de 100 µL e semeadas, com alça de Drigalsky, em meio 523 e Caseína-dextrose-ágar (CDA) (CNPMA, 2006; ROMEIRO, 2007). As placas de Petri foram incubadas a 28°C por 48, 72 e 96 h. As colônias dos microrganismos isoladas com diferentes aspectos morfológicos foram purificadas ressemeadas em meio 523 e após crescimento repicadas para tubos de ensaio contendo o meio 523 inclinado.

2.2 Manutenção dos isolados

A preservação dos isolados bacterianos candidatos a biocontroladores foi realizada pelo método de sub-cultura. Todos os isolados foram mantidos em tubos de ensaio com tampa rosqueável contendo meio 523 inclinado e vertical sob óleo mineral sendo armazenados a 4°C (SMITH & ONIONS, 1994). Esses isolados foram preservados também em micro tubos com uma formulação à base de

polímero contendo 1 g de goma xantana e 1,5 g de polivinilpirrolidona (PVP) armazenados a 4°C (DENARDIN & FREIRE, 2000 e TUMELEIRO & DENARDIN, 2008).

2.3 Origem da *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

O isolado de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) foi obtido da coleção de bactérias do Instituto Biológico, Estação Experimental de Campinas, SP.

2.4 Bioensaio I: Avaliação massal *in vitro* contra *Psg*

Para a prospecção da potencialidade antagonística dos possíveis agentes de biocontrole foi realizada a avaliação massal *in vitro* contra *Psg*. Suspensão da bactéria *Psg* foi obtida após o cultivo desta por 48 h em meio líquido 523, sob agitação e temperatura de 28 °C da qual retirou-se uma alíquota de 100 µL ($OD_{540} = 0,2$) sendo depositada na superfície do meio de cultivo 523 sólido espalhando-se com alça de Drigalski. Após 30 minutos foram colocados alíquotas de 10 µL de suspensão dos candidatos à antagonistas à *Psg*, os quais foram distribuídos equidistantes em três pontos da placa de Petri sob o cultivo de *Psg*. As placas foram mantidas a 28 °C e inspecionadas diariamente, observando-se antagonismo pela presença ou não de halo ou pelo crescimento dos antagonistas sob o patógeno (*Psg*). Procedeu-se a realização dos ensaios posteriores com os que se apresentaram como potenciais antagonistas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído de três repetições.

2.5 Bioensaio II: Biocontrole *in vitro* de *Psg*

A partir do ensaio de seleção massal (Bioensaio I) os isolados que apresentaram potencial contra a *Psg* foram testados novamente a fim de verificar *in vitro* os antagonistas com maior potencial de biocontrole. Para a obtenção da suspensão da bactéria *Psg* esta foi cultivada por 48 em meio líquido 523, sob agitação e temperatura de 28 °C. Deste cultivo preparou-se uma suspensão bacteriana ($OD_{540} = 0,2$) de onde retirou-se uma alíquota de 100 μL a qual foi depositada sobre o meio de cultura 523 sólido e espalhado com alça de Drigalski. Após 30 minutos foram colocados alíquotas de 10 μL ($OD_{540} = 0,3$) de suspensão dos candidatos as quais foram distribuídas equidistantes em três pontos da placa de Petri sobre o cultivo de *Psg*. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com nove repetições. Após 96 h, as formas de inibição foram mensuradas a partir da borda da gota do antagonista.

2.6 Bioensaio III: Espectro de ação de isolados antagonistas contra o fungo *Corynespora cassiicola*:

O fungo *Corynespora cassiicola*, agente causal da mancha alvo na soja, foi obtido da coleção de fungos do Laboratório de Micologia – UPF. Discos de 8 mm de diâmetro foram depositados no centro de placas de Petri contendo o meio BDA (Batata Dextrose Ágar).

Para a realização do teste, foram utilizados oito isolados UPF 030 (filoplano de milho), UPF035 (semente de algodão), UPF 050

(filoplano bolão-de-ouro), UPF 091 (semente de papuã), UPF 096 (rizosfera de papuã), UPF 154 (solo de campo nativo), UPF 198 e UPF 200 (solo de lavoura).

Os antagonistas foram cultivados em meio 523 sólido, e incubados a 28 °C durante 48 h.

2.6.1 Prospecção da atividade antagonista dos isolados contra *Corynespora cassiicola*.

Discos de micélio de 8 mm do fungo foram depositados no centro da placa contendo o meio de cultura do BDA. Após, com o auxílio de tubos de ensaio de 50 mm de diâmetro esterelizados, procedeu-se a transferência do antagonista para a placa contendo o fungo. Para tanto, umedeceu-se a borda de abertura do tubo de ensaio na suspensão bacteriana e, a seguir, imprimiu-se a mesma sobre o meio de cultura ao redor do disco com o fungo.

As placas de Petri foram incubadas à 25 ± 2 °C em câmara climatizada com fotoperíodo de 12 horas durante 10 dias.

As avaliações foram feitas aos 5 e 10 dias, observou-se a expansão do micélio do patógeno. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 8 tratamentos, cada tratamento foi constituído por 5 repetições.

2.7 Análises estatísticas

Os dados das avaliações, foram submetidos a análise estatística, realizada através do Programa SASM-Agri (Sistema para

Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas), versão 8.2 e Teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade para o bioensaio II, e para o bioensaio III foi realizado o Teste de Duncan a 5% de probabilidade (CANTERI et al., 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados um total de 202 candidatos a antagonistas de diferentes espécies de plantas e locais de isolamentos (Tabela 1), sendo 73 isolados da rizosfera, 15 isolados de sementes, 46 isolados do filoplano, 68 isolados de solo.

Tabela 1 – Isolados que foram testados contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv, *glycinea*

Origem do Isolado	Sítio de Isolamento		Nº de isolados
Soja (<i>Glycine max</i>)	Raiz	UPF001 a UPF011	23
	Semente	UPF012 a UPF021	
	Folha	UPF022; UPF023	
Milho (<i>Zea mays</i>)	Rizosfera	UPF024 a UPF027	08
	Colmo	UPF028; UPF029	
	Folha	UPF030	
	Pendão	UPF031	
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Folha	UPF032	01
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Folha	UPF033	01
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Semente	UPF034	01
Algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>)	Semente	UPF035; UPF036	02
Melão (<i>Cucumis melo</i>)	Semente	UPF037	01
Abacaxi (<i>Ananas comosus</i>)	Folha	UPF038 a UPF040	03

Cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	Rizosfera	UPF041; UPF042	07
	Raiz	UPF043 a UPF045	
	Colmo	UPF046; UPF047	
Boldo (<i>Vernonia condensata</i>)	Folha	UPF048; UPF049	02
Bolão de ouro (<i>Cassia macranthera</i>)	Folha	UPF050; UPF051	02
Arruda (<i>Ruta graveolens</i>)	Raiz	UPF052 a UPF056	07
	Folha	UPF057; UPF058	
Cebolinha (<i>Allium schoenoprasum</i>)	Folha	UPF059; UPF060	02
<i>Brachiaria</i> sp.	Rizosfera	UPF061	02
	Folha	UPF062	
Milha (<i>Digitaria sanguinalis</i>)	Raiz	UPF063 a UPF065	05
	Rizosfera	UPF066	
	Folha	UPF067	
Capim-annoni (<i>Eragrostis plana</i> Nessl.)	Raiz	UPF071; UPF072	04
	Rizosfera	UPF073	
Azevém (<i>Lolium multiflorum</i>)	Raiz	UPF075	03
	Rizosfera	UPF076; UPF077	
	Folha	UPF074	
Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Raiz	UPF078	04
	Rizosfera	UPF079	
	Folha	UPF080	
	Espiga	UPF081	
<i>Paspalum notatum</i>	Raiz	UPF083	04
	Rizosfera	UPF082	
	Folha	UPF084; UPF085	
<i>Brachiaria decumbis</i>	Semente	UPF091	01
	Raiz	UPF068; UPF087; UPF108 a UPF114	47
Papuã (<i>Brachiaria plantaginea</i>)	Rizosfera	UPF069; UPF086; UPF092 a UPF 107; UPF115 a UPF121	
	Colmo	UPF122	
Folha	UPF070; UPF088 a UPF090, UPF123 a UPF130		
Bromélia nativa (<i>Vriessia</i> spp)	Folha	UPF131 a UPF134	04
Solo (Campo Nativo)		UPF135 a UPF169	34
Solo (Lavoura)		UPF170 a UPF202	33
			202

Na avaliação dos isolados contra a fitobactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) foram pré-selecionados 42 promissores agentes de controle biológico do cretamento bacteriano da soja.

Os resultados obtidos nesse trabalho são semelhantes aos encontrados por Moura; Romeiro, (1999) que isolaram e testaram *in vitro* 190 actinomicetos contra 52 isolados de *Ralstonia solanacearum*.

Conforme M'Piga et al., (1997) os isolados apresentaram dois mecanismos de inibição da fitobactéria. Os isolados que cresceram sobre a bactéria, apresentaram mecanismo de competição por espaço e nutrientes com a fitobactéria, incluindo um isolado da Coleção do Laboratório da UPF identificado neste trabalho como UPF208 que já foi testado anteriormente e obteve sucesso no controle *in vivo* da bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* que causa o cretamento bacteriano comum no feijoeiro (AGOSTINI, 2004; SBALCHEIRO, 2006). Já nos outros isolados testados, observou-se a produção de substâncias deletérias ao fitopatógeno através da formação de um halo de inibição.

Na figura 1, onde foram avaliados trinta e três isolados contra a *Psg*, oito bactérias destacaram-se como agentes de biocontrole. Os isolados UPF198, UPF201 e UPF200, oriundos de solo de lavoura, UPF035 e UPF036, obtidos de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*), UPF030 (filoplano de milho), UPF091 (semente de *Brachiaria decumbis*), UPF154 (solo de campo nativo). Pode-se ressaltar que o biocontrolador UPF035 apresentou crescimento de 39,62 mm sobre o *Psg* diferindo-se dos demais isolados.

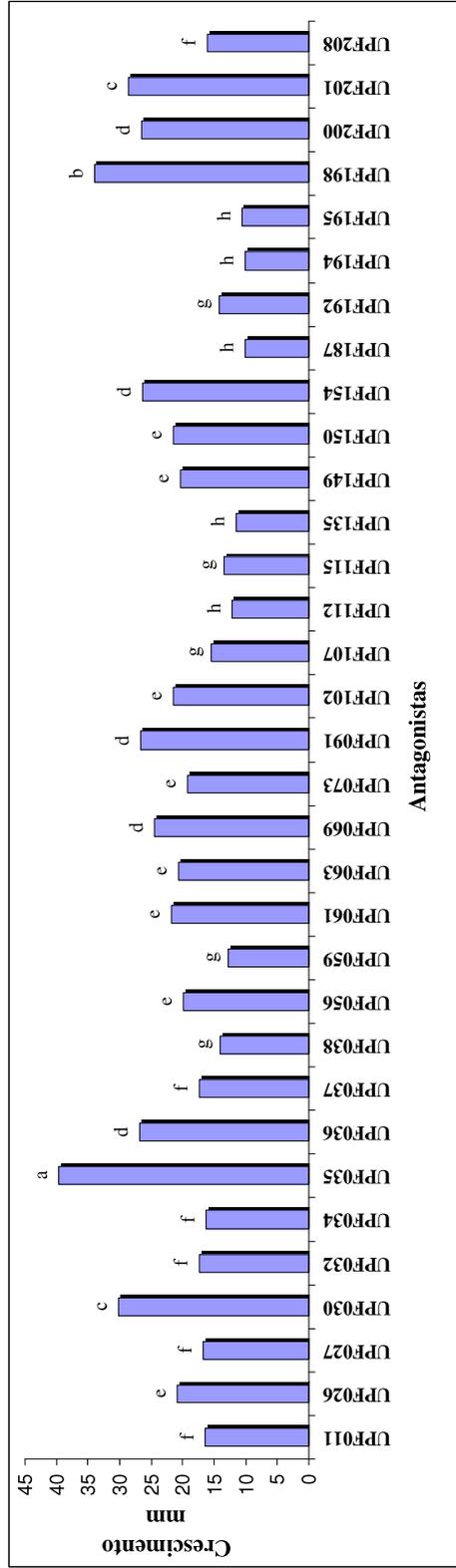


Figura 1 – Médias do crescimento dos isolados testados in vitro para antagonismo contra a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. Médias dos tratamentos seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

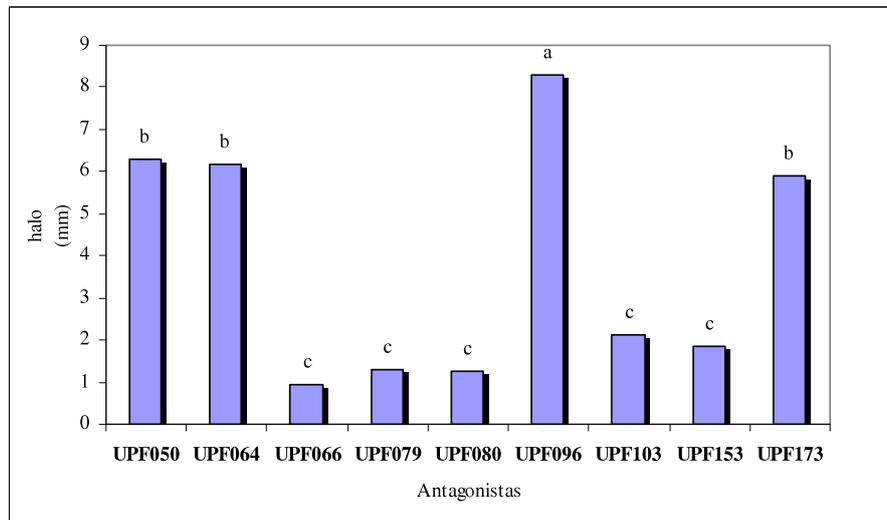


Figura 2 – Médias de halos formados *in vitro* por isolados contra *Psg*. Médias dos tratamentos seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5 % de probabilidade.

Os antagonistas que formaram halo de antibiose contra *Psg* estão representados na Figura 2. O antagonista UPF096 oriundo da rizosfera de papuã (*Brachiaria plantaginea*) apresentou média de halo de inibição de 8,30 mm destacando-se estatisticamente em relação aos demais antagonistas como o UPF050 oriundo de filoplano de folha de bolão de ouro (*Cassia macranthera*) e UPF064 obtido de raízes de milhã (*Digitaria sanguinalis*) que apresentaram média de tamanho do halo de 6,27 mm e 6,17 mm, respectivamente.

São escassos os trabalhos em que a eficácia do antagonista não está relacionada, pelo hospedeiro, ou pelo habitat do qual foi isolado. Os resultados obtidos nesse trabalho estão em concordância, com os resultados relatados por Lima, (2003), que isolou 158 actinomicetos de solo rizosférico de bananeira, maracujazeiro, e de diversas olerícolas, sob solo de mangueira e sob jaqueira, de terra de mata

Atlântica, composto orgânico e solo com adubação verde incorporada e avaliou o biocontrole *in vitro* contra quatro isolados da fitobactéria *Ralstonia solanacearum*. Obteve 41 isolados que demonstraram potencial de biocontrole *in vitro* contra um ou mais isolados da bactéria.

Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com os resultados obtidos por diversos pesquisadores para diferentes patossistemas onde os foram isolados diversos agentes de biocontrole de diferentes nichos e espécies que também proporcionaram a formação de halos de inibição.

Na prospecção dos isolados contra o fungo *Corynespora cassiicola*, verificou-se que os isolados reduziram o crescimento do fungo comparando-se com a testemunha (Tabela 2).

Tabela 2 – Média de crescimento do fungo *Corynespora cassiicola* na presença de oito isolados de bactérias em relação a testemunha.

Tratamentos	<i>Corynespora cassiicola</i> mm de micélio	
	5 dias	10 dias
Controle	44,70 a	77,36 a
UPF030	20,83 cd	23,55 bc
UPF035	24,20 c	28,74 b
UPF050	33,63 b	70,33 a
UPF091	16,92 d	19,78 c
UPF096	43,20 a	74,45 a
UPF154	20,83 cd	21,94 bc
UPF198	16,21 d	19,85 c
UPF200	23,91 c	26,44 bc
C.V. %	11,73	14,18

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os isolados UPF091 (semente de *Brachiaria decumbis*) e UPF198 (solo de lavoura) apresentaram controle do fungo aos 5 dias de 62% e 63%, respectivamente. Em relação a testemunha verificou-se que os isolados UPF030 e UPF154 apresentaram o mesmo percentual de biocontrole do fungo, cerca de 53%, os isolados UPF200 e UPF035 apresentaram controle semelhante em torno de 46% e 45%, respectivamente. O agente de biocontrole UPF096 não apresentou potencial de controle do fungo. Já aos 10 dias, verificou-se que o isolado UPF050 não foi efetivo. Porém os isolados UPF091 e UPF198 continuaram efetivos contra o patógeno, com percentagem de controle em torno de 73%.

Esses resultados estão de acordo com Pessoa et al (2004) obtiveram 36 antagonistas oriundos de húmus de minhoca, os isolados foram testados *in vitro* contra o fungo *Myrothecium roridum* que é responsável por causar danos a um grande número de hospedeiros, inclusive no melão. Os isolados BH28 e BH37, destacaram-se dos demais, pois apresentaram inibição de 61% do crescimento micelial do fungo, seguidos da levedura LH5 e da bactéria BH25 que inibiram 55% do patógeno.

Isolados endofíticos também foram usados por Shiomi et al. (2008) que selecionou 95 isolados de bactérias endofíticas do milho com potencial de uso no biocontrole de fungos fitopatógenos em testes de antagonismo *in vitro*. Foram selecionados 6 isolados quanto à inibição a *Pythium aphanidermatum*. Essas bactérias pré-selecionadas foram testadas novamente contra os patógenos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum turcicum*, foram incluídos um isolado de *Bacillus subtilis* 0G, *Bacillus*

lentimorbus e *Streptomyces* sp., para verificação de antagonismo. Os endofíticos *B. subtilis* 0G, *B. lentimorbus* e *Streptomyces* sp., apresentaram ação antagônica superior aos demais, com taxas de inibição entre 32,0% e 53,8%. Dentre os endofíticos do milho, *Bacillus agaradhaerens* foi o que mais se destacou, com taxas de inibição variando entre 43,7% e 52,3% e indicando uma inespecificidade de ação.

Corrêa et al. (2008) avaliaram *in vitro* os isolados de *Pseudomonas veronii* (DFs513), *Bacillus* spp. (DFs093 e DFs348), *Bacillus cereus* (DFs769), *Rhodococcus fascians* (DFs843 e DFs912) e *Pseudomonas fluorescens* (DFs831 e DFs842), previamente selecionados para o controle de *Xanthomonas axonopdis* pv. *phaseoli*, bem como a combinação de alguns destes isolados bacterianos contra *Colletotrichum lindemuthianum* agente causal da antracnose no feijão. Nos testes *in vitro*, quatro isolados inibiram *C. lindemuthianum*. Os isolados com resultados positivos pertencem aos gêneros *Pseudomonas* (DFs831 e DFs842) e *Rhodococcus* (DFs843 e DFs912).

Sottero et al. (2006) testaram *in vitro* 64 isolados bacterianos oriundos da rizosfera de algodoeiro, milho, soja, citros, couve, alface e solo solarizado contra o fungo *Fusarium* sp obtido do solo rizosférico de alface. Desses 12 isolados de *Pseudomonas* cerca de 18% do total impediram o crescimento do fungo sobre as colônias bacterianas, indicando uma possível competição por nutrientes.

Ainda que os testes *in vitro* nem sempre apresentem o mesmo resultado *in vivo* (FREITAS; PIZZINATTO, 1991), há quem defenda seu uso, baseando-se no fato de que a detecção de isolados com

características antagônicas eficientes poderiam facilitar uma primeira seleção, já que frequentemente se trabalha com grande número de isolados (LUCON & MELO, 1999).

Os agentes de controle biológico que são isolados de microbiotas complexas, pouco conhecidas e ricas em biodiversidade, são difíceis de serem identificados, às vezes somente com métodos sofisticados e não disponíveis na maioria dos laboratórios, como seqüenciamento do gene ribossomal 16S ou análise de perfil de ácidos graxos. No entanto, testes básicos podem permitir uma caracterização parcial, por exemplo, a presença de endósporos que indica a possibilidade de tratar-se do gênero *Bacillus* sp., ou a produção de pigmentos fluorescentes pode sugerir tratar-se de uma espécie de *Pseudomonas* (ROMEIRO, 2007).

Os isolados UPF035 e UPF096 foram caracterizados quanto as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas, tais como características da colônia, forma da célula, Reação de Gram, KaOH, Oxidase, Catalase, Pigmentos fluorescentes, Formação de endosporos Hipersensibilidade no tabaco (HR), conforme tabela 3.

Tabela 3 – Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos isolados UPF035 e UPF096.

Características	Isolados	
	UPF035	UPF096
Colônia	Irregular de superfície lisa	Irregular de superfície lisa
Aspecto da Colônia	Translúcida brilhante	Creme brilhante
Borda	Irregular	Irregular
Forma da célula	Bacilar	Bacilar
Reação de Gram	+	-
KaOH	-	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	-
Pigmento fluorescente	Ausente	Ausente
Endosporo	Presente	Presente
HR (Fumo)	-	-

Baseando-se nos testes realizados pode-se constatar que os biocontroladores UPF035 e UPF096 pertencem ao gênero *Bacillus* pela ausência de pigmentos fluorescentes e presença de endosporos. Entretanto devem ser realizados testes mais sofisticados para a confirmação do gênero e espécie dos isolados bacterianos.

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Os procariotos isolados de diferentes nichos de várias espécies de plantas demonstraram potencial *in vitro* contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.
- Alguns isolados também demonstraram potencial *in vitro* para biocontrole do fungo *Corynespora cassicola*.

CAPÍTULO II
AVALIAÇÃO FITOSSANITÁRIA DE SEMENTES DE SOJA
MICROBIOLIZADAS COM BACTÉRIAS ANTAGONISTAS

FERNANDA DA SILVA VILASBÔAS¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN²

RESUMO – A cultura da soja é afetada, no campo, por diversos patógenos como fungos, bactérias e vírus que podem ocasionar perdas para a sojicultura em geral. A maioria desses patógenos utilizam a semente como veículo de sobrevivência e de disseminação a longas distâncias. A microbiolização de sementes visando biocontrole de patógenos tem sido uma estratégia frequentemente utilizada. Com isso, este trabalho objetivou testar a eficiência de dois isolados UPF035 (oriundo de solo nativo) e UPF096 (oriundo de semente de algodão) no controle dos principais patógenos da soja, em condições de laboratório através da microbiolização das sementes das cultivares CD 214 RR e BRS 244 RR. Foi observado o controle de fungos de armazenamento como *Penicillium* sp., *Aspergillus* spp. e *Drechslera* sp. e de fungos fitopatogênicos como *Phomopsis* sp. e *Fusarium* spp. Concluindo-se que são efetivos contra os patógenos nas sementes, podendo, futuramente, serem feitas formulações para o uso destes no tratamento de sementes de soja.

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra., professora da FAMV/PPGAgro/UPF - norimar@upf.br

Palavras-chave: patologia de sementes, biocontrole, qualidade fitossanitária.

PATOLOGY EVALUATION OF SOYBEAN SEEDS MICROBIOLIZED WITH ANTAGONIC BACTERIA

ABSTRACT - The soybean crop is affected by several diseases caused by fungi, bacteria and viruses that can reduce grain yield. Many of these pathogens are seed borne and spread to long distances. Seed microbiolization is often used as a control strategy to manage plant pathogens. In this research, two isolates of biocontrol agents (UPF035 derived from native soil; UPF096 derived from cotton seed) were evaluated regarding their efficacy on the control of seed borne fungi, by means of seed microbiolization of two soybean cultivars (BRS 244 RR and CD 214 RR). Both isolates were effective in controlling species of *Penicillium* sp., *Drechslera* sp., *Aspergillus* spp., *Phomopsis* sp., and *Fusarium* spp., thus showing potential for future use in commercial formulations for seed treatment on soybeans.

Key-words: seed pathology, biocontrol, phytosanitary quality.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja é afetada, no campo, por diversos patógenos como fungos, bactérias e vírus os quais causam perdas para a sojicultura em geral. A maioria desses patógenos utiliza a semente como veículo de sobrevivência e de disseminação a longas distâncias.

Sementes são insumos básicos na produção agrícola moderna. Todas as espécies cultivadas propagadas por sementes apresentam doenças como fator responsável pela redução na produtividade (MENTEN, 1995).

A maioria dos patógenos associados às sementes é transmitida para a parte aérea das plântulas e podem ser visualizados através de sintomas característicos (lesões). Nessas lesões o patógeno se reproduz e seus propágulos são disseminados e infectam tecidos da planta e em plantas vizinhas, aumentando a quantidade de doença na área cultivada. Quanto maior a incidência do patógeno nas sementes maior será a porcentagem de focos no campo e mais cedo terá início a epidemia.

A análise de rotina de sanidade de sementes contribui para a avaliação da qualidade de lotes de sementes em culturas de importância econômica, provavelmente devido ao fato de suas sementes transportarem patógenos que podem causar danos à germinação ou quando transmitidas aos órgãos aéreos causando doenças na cultura e afetando a produção (MORAES, 1995).

Segundo Menten (1996), o tratamento biológico é a incorporação artificial de agentes de controle biológico às sementes. As bactérias antagonistas podem ser veiculadas à semente através da microbiolização. O princípio básico do controle biológico é a ação exercida por determinados microrganismos que eliminam, impedem ou reduzem o desenvolvimento de patógenos transportados pela semente ou presentes no solo.

A microbiolização de sementes pode constituir uma opção potencial para o controle de fitopatógenos habitantes do solo, bem

como para diminuir os problemas ambientais decorrentes do uso de produtos químicos no ambiente (LUZ, 1993).

O objetivo deste trabalho foi testar a eficiência de dois isolados biocontroladores UPF035 (oriundo de solo nativo) e UPF096 (oriundo de semente de algodão) no controle dos principais patógenos da soja, em condições de laboratório através da microbiolização das sementes das cultivares CD 214 RR e BRS 244 RR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Avaliação fitossanitária e fisiológica de sementes de soja tratadas e não tratadas com biocontroladores

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as cultivares de soja CD 214 RR, BRS 244 RR, microbiolizadas com os agentes de biocontrole UPF035 e UPF096.

2.1.1 Preparo das bactérias para microbiolização das sementes

As sementes foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 1% por dois minutos, após foram lavadas três vezes em água destilada para retirar o resíduo do hipoclorito. Então, o plaqueamento das sementes dos tratamentos sem biocontroladores foi procedido. Colônias puras dos biocontroladores UPF035 e UPF096 crescidas em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 48hs, foram suspensas em 5 mL de solução salina de NaCl a 0,85%.

A microbiolização das sementes constituiu da adição de 3,5 mL dos biocontroladores com $OD_{540} = 0,3$ sobre 500 g de sementes das cultivares UPF035 e UPF096, acondicionadas em sacos plásticos. Para a completa microbiolização os sacos foram fechados e agitados suavemente por 10 minutos, e foram mantidos em câmara de fluxo laminar por 3 h. Após foram plaqueadas em caixas Gerbox contendo o meio BDA (Batata Dextrose Agar). Para o teste utilizaram-se 400 sementes por tratamento dos cultivares CD 214 RR e BRS 244 RR. Os tratamentos foram: sementes sem biocontrole e com biocontrole.

O teste de germinação foi realizado com as sementes das cultivares CD 214 RR e BRS 244 RR sem biocontroles e com biocontroles. Para tanto, foram utilizadas 400 sementes distribuídas em caixas de acrílico tipo gerbox contendo o meio de cultura Batata Dextrose Agar BDA.

O material foi incubado em sala a $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sob 12 h de fotoperíodo sob alternância de luz fluorescente e escotofase fixa de 12 horas, durante 7 dias.

2.2 Avaliação da qualidade fitossanitária e % de germinação

Após 7 dias avaliou-se a incidência de fungos e germinação nas sementes tratadas e não-tratadas com os biocontroladores. A quantificação da incidência em sementes foi feita sob lupa estereoscópica (50X) considerando-se infectada a semente com presença de conidióforo e/ ou conídio do fungo. Após este período contou-se as sementes germinadas em cada tratamento. O delineamento experimental foi

inteiramente casualizado, com três tratamentos, cada tratamento foi constituído de 4 repetições de 100 sementes cada.

Os dados de incidência de fungos foram transformados para $\sqrt{x+1}$ e submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (CANTERI et al., 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A desinfestação superficial, procedida nas sementes de soja com hipoclorito de sódio, antes do plaqueamento no meio BDA, foi feita visando reduzir a incidência fungos contaminantes que ficam aderidos na superfície das sementes, pois os mesmos podem encobrir a incidência de fungos, alvo de estudos, em virtude da concentração do produto utilizado, esse não elimina os contaminantes presentes, somente reduz a incidência, conforme pesquisa realizada por Zorato et al. (2001).

Nas sementes da cultivar CD 214 RR conforme Tabela 1, para o tratamento 1, foi observado a presença de sete espécies de fungos infectando a semente, tais como: *Penicillium* sp., *Aspergillus* spp., *Phomopsis* sp., *Fusarium* spp., *Drechslera* sp., *Alternaria alternata*, *Cercospora kikuchii*.

Na análise de patologia de sementes para a cultivar CD 214 RR (Tabela 1) para sementes não microbiolizadas com os biocontroles, observa-se a presença de vários fungos infectando as sementes, sendo que a maior incidência foi para o fungo *Penicillium* sp (*P. sp.*), fungo este relacionado com armazenamento. A presença de *Aspergillus* spp (*A. spp.*), *Phomopsis* sp (*Ph sp.*), *Fusarium* spp

(*F.spp.*), *Drechslera* sp (*D. sp.*), *Alternaria alternata* (*A.a*), *Cercospora kikuchii* (*C.k*) tiveram comportamento semelhante.

Tabela 1– Incidência (%) de fungos em sementes de soja cv. CD 214 RR.

Tratamentos	CD 214 RR							
	*Fungos	<i>P. sp.</i>	<i>A. spp.</i>	<i>Ph. sp.</i>	<i>F. spp.</i>	<i>D. sp.</i>	<i>A.a</i>	<i>C.k</i>
T1		6,33 a	1,99 a	1,39 a	2,10 a	1,53 a	2,71 a	1,46 a
T2		6,05 a	1,10 b	1,28 a	1,00 c	1,00 b	1,64 c	1,57 a
T3		5,73 a	1,53 ab	1,28 a	1,53 b	1,20ab	2,23 b	1,20 a
CV %		5,95	19,45	25,59	19,77	22,78	13,48	18,74

*Tratamentos: T1 = controle, T2= sementes microbiolizadas com o isolado UPF 035, T3 = sementes microbiolizadas com o isolado UPF 096. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Verifica-se no tratamento 2 (Figura 1), para sementes microbiolizadas com o biocontrole UPF035, que este foi efetivo para controle de *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Drechslera* sp. e para *Alternaria alternata*. Obtendo-se uma redução de 44,70%, 52,38%, 34,65% e de 39,40% respectivamente.

Para o tratamento 3, a menor incidência foi observada para *Fusarium* spp. redução de 27%, para *Drechslera* sp. redução de 22% e para *Alternaria alternata* redução de 18%, comparado ao tratamento 1 (sementes não microbiolizadas). Sendo que a menor incidência foi para *Fusarium* spp.

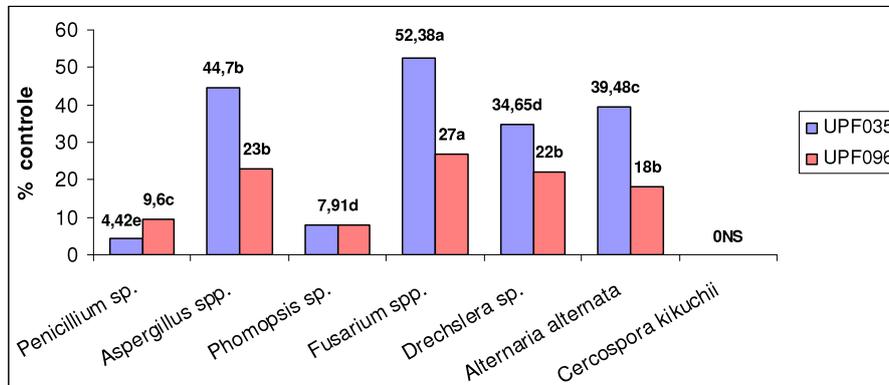


Figura 1 – Porcentagem de controle dos isolados UPF035 e UPF096 na cv. CD 214 RR. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

De modo geral, o biocontrolador UPF035 oriundo de semente de algodão apresentou potencial superior de controle biológico dos fungos apresentados nas sementes da cultivar CD 214 RR em comparação com o biocontrolador UPF096.

Na análise de patologia de sementes para a cultivar BRS 244 RR conforme tabela 2, observou-se seis espécies de fungos infectando a semente, tais como: *Penicillium* sp. (*P. sp.*), *Aspergillus* spp. (*A. spp.*), *Phomopsis* sp. (*Ph. sp.*), *Fusarium* spp. (*F. spp.*), *Alternaria alternata* (*A.a*) e *Cercospora kikuchii* (*C.k*).

O comportamento dos biocontroladores UPF035 e UPF096 para sementes da cultivar BRS 244 RR (Tabela 2) foi semelhante ao cultivar CD 214 RR. Salienta-se que nesse cultivar não foi observada a presença do fungo *Drechslera* spp, que pode causar deterioração em sementes armazenadas.

Tabela 2– Incidência (%) de fungos em sementes de soja na cv. BRS 244 RR.

Tratamentos	BRS 244 RR						
	Fungos	<i>P. sp.</i>	<i>A. spp.</i>	<i>Ph. sp.</i>	<i>F. spp.</i>	<i>A.a</i>	<i>C.k</i>
T1		3,56 a	1,64 a	2,44 a	2,10 a	1,43 a	1,31 a
T2		3,06 a	1,00 b	1,49 b	1,10 b	1,00 a	1,31 a
T3		2,17 a	1,49 a	1,57 b	1,20 b	1,00 a	1,39 b
CV %		11,21	13,59	9,26	17,34	25,82	18,11

*Tratamentos: T1 = controle, T2= sementes microbiolizadas com o isolado UPF 035, T3 = sementes microbiolizadas com o isolado UPF 096. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Pode-se destacar também nesse cultivar maior incidência do fungo *Phomopsis* sp. com maior porcentagem de biocontrole para os tratamentos T2 e T3. Observando-se uma redução da incidência de 38,9% para T2 e de 36% para T3.

O tratamento 2 apresentou-se superior para o controle de *Penicillium* sp. com redução de 39% em relação ao T3 que apresentou diminuição de 14% (Figura 2). O biocontrolador UPF096 (T3) demonstrou ser mais efetivo para o fungo *Aspergillus* spp., com diminuição da incidência em 39%, em comparação ao biocontrole UPF035 que foi de 9%.

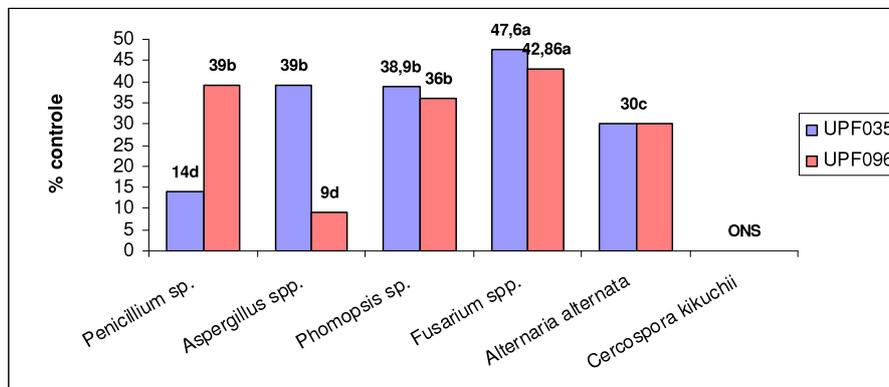


Figura 2 – Porcentagem de controle dos isolados UPF035 e UPF096 Na cv. BRS 244 RR. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Os biocontroles UPF035 e UPF096 dispensados na semente em ambas as cultivares não apresentaram efeito inibitório sobre o fungo *Cercospora kikuchii*, pois a incidência deste é avaliada pelo sintomas nas sementes, que apresentam coloração violeta.

Constata-se que os biocontroles utilizados possuem potencial de reduzir a incidência de alguns fungos presentes nas sementes, proporcionando redução de 20% (média geral) na incidência destes nas sementes.

Entretanto, sugere-se continuidade das avaliações com o intuito de verificar dentre os isolados, a combinação que melhor expresse efetivo controle, bem como estudar concentrações diferenciadas visando o melhor efeito bioprotetor sobre patógenos veiculados as sementes.

Esses resultados corroboram com Luz, (2001) que analisou o efeito de dez biocontroles *in vitro* em sementes de milho, constatando, que a maioria dos bioprotetores reduziu significativamente nível de

infecção de patógenos nas sementes, destacando-se *Paenibacillus macerans* e *Bacillus subtilis* e os biótipos A e B de *Pseudomonas putida*, *Trichoderma harzianum* e *T. virens* foram particularmente eficientes no controle de *F. graminearum* e de *D. maydis*, não apresentaram eficiência contra *F. moniliforme* e contra *Aspergillus* spp. que a maioria dos agentes de biocontrole diminuiu significativamente a porcentagem de fungos nas sementes.

Luz, (2003), avaliou o efeito *in vitro* do bioprotetor *Paenibacillus macerans* (Embrapa 144) e do fungicida difenoconazole juntos e em combinação, em sementes de trigo, verificou que todos os tratamentos reduziram significativamente a incidência de fungos nas sementes e em geral o tratamento biológico equivaleu-se ao tratamento químico.

Pessoa et al. (2004), avaliaram dois antagonistas BH 28 e BH 37, oriundos de húmus de minhoca, previamente selecionados *in vitro* contra *Myrothecium roridum*, foram testados novamente em duas cultivares de melão inoculadas com o patógeno alvo. As sementes foram microbiolizadas com os agentes de biocontrole e tratadas com benomil. Em ambas as cultivares de melão, Honey Dew e AFX 1629, os melhores tratamentos foram com o isolado BH 37 que diminuiu a incidência do fungo para 18% e o benomil apresentou incidência de 16%.

Juntamente as análises fitossanitárias das sementes realizou-se a avaliação da germinação. Observa-se na tabela 3, que os dois agentes de biocontrole UPF035 e UPF096 não afetaram a germinação de ambas cultivares quando aplicados sobre as sementes.

Tabela 3 – Percentagem de germinação das sementes de soja das cv. CD 214 RR e BRS 244 RR submetidas a três tratamentos.

Tratamentos*	% de sementes germinadas	
	CD 214 RR	BRS 244 RR
T1	99,00 a	92,75 a
T2	99,25 a	93,25 a
T3	99,00 a	95,25 a
CV (%)	1,87	13,53

*Tratamentos: T1 = controle, T2= sementes microbiolizadas com o isolado UPF 035, T3 = sementes microbiolizadas com o isolado UPF 096. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Esses resultados são semelhantes aos resultados encontrados por Pessoa et al. (2004) que avaliaram o efeito *in vitro* de dois isolados BH 28 e BH 37, microbiolizados em duas cultivares de melão. As sementes também foram testadas com o fungicida benomil. Na cultivar “Honey Dew” verificou-se que todos os tratamentos aumentaram significativamente a percentagem de germinação em relação à testemunha, o isolado BH 37 e o fungicida benomil apresentaram 78% e 76% de germinação respectivamente. A germinação no tratamento com o antagonista BH 37 na cv. AFX 1629, foi de 93%, nas sementes tratadas com benomil a germinação foi de 72% e a testemunha apresentou 24% das sementes germinadas.

De um modo geral, os biocontroladores reduziram a incidência de fungos nas sementes das duas cultivares de soja, e não afetaram a germinação, indicando que futuramente em estudos sendo utilizados sozinhos, em combinações ou em formulações possam ser efetivos para tratamento de sementes.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os isolados UPF 036 e UPF096 microbiolizados em sementes de soja reduziram significativamente a incidência de vários fungos presentes nas sementes.

CAPÍTULO III
USO DE BACTÉRIAS NO CONTROLE DO CRESTAMENTO
BACTERIANO DA SOJA

FERNANDA DA SILVA VILASBÔAS¹, NORIMAR D'ÁVILA
DENARDIN²

RESUMO – O crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, é uma das principais doenças da soja em regiões de clima temperado. Em cultivares suscetíveis, as medidas de controle preventivo resumem-se ao uso de sementes livres do patógeno e à adoção da rotação de culturas. O uso de microrganismos antagonistas, com ação direta sobre o patógeno e/ou ativação dos mecanismos de defesa da planta, é uma alternativa promissora no manejo de doenças de plantas. Este trabalho objetivou avaliar o potencial de dois agentes de biocontrole, previamente selecionados *in vitro*, sobre o controle do crestamento bacteriano da soja. Os biocontroladores foram utilizados em microbiolização das sementes ou aspersão nos órgãos aéreos de plantas mantidas em casa-de-vegetação. Avaliou-se o tamanho das lesões do crestamento bacteriano, que foi até 55% menor nas plantas de sementes microbiolizadas, e 48% menor nas aspergidas.

¹ Bióloga, Mestranda do Programa de Pós-graduação em Agronomia (PPGAgro) da FAMV/UPF, Área de Concentração em Fitopatologia.

² Orientadora, Bióloga, Dra., professora da FAMV/PPGAgro/UPF - norimar@upf.br

Palavras-chave: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, controle biológico, agentes de biocontrole.

USE OF BACTERIA TO CONTROL BACTERIAL BLIGHT OF SOYBEANS

ABSTRACT: - The bacterial blight of soybean is one of the most common diseases and is distributed worldwide. The disease is caused by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. However, in the region of temperate climate, where the temperature is more pleasant, that the disease occurs more frequently and more severely, with high capacity for destruction leaf. In the absence of resistant cultivars to this disease, preventive measures to control lies in the use of seeds free of the pathogen and the adoption of crop rotation. The use of antagonistic microorganisms to different pathogens, with direct action on the pathogen and/or activating the defense mechanisms of the plant, has been promising alternative in the management of diseases of plants. This work aimed to evaluate the potential of two biocontrol agents, previously selected *in vitro*, act in reducing the bacterial blight of soybean. In plants where the seeds were microbiolized with isolates had reduced the size of the lesion in up to 55%, and the plants that were sprayed with the biocontrol of the lesion was reduced by 48%.

Key-words: *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, biological control.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja possui grande importância para a economia brasileira, sendo seu complexo o líder de exportações do agronegócio do país. A manutenção desse patamar depende muito da produtividade da cultura e entre os principais fatores limitantes à obtenção de elevados rendimentos dessa cultura, está a ocorrência de doenças.

Dentre as bacterioses, as mais importantes são o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, e a pústula bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (HENNING et al, 2005).

O crestamento bacteriano é uma das doenças mais comuns, estando mundialmente distribuída. É, porém, na região de clima temperado, onde a temperatura é mais amena, que essa doença ocorre com maior frequência e maior severidade, tendo elevada capacidade de destruição foliar.

Na inexistência de cultivares resistentes a essa enfermidade, medidas de controle preventivo resumem-se ao uso de sementes livres do patógeno e adoção de rotação de culturas (ALMEIDA et al., 2005; EMBRAPA SOJA, 2007). Essas técnicas, entretanto, nem sempre são respeitadas, fundamentalmente, por aspectos de natureza econômica, inferindo a necessidade de geração de tecnologia de controle alternativa.

A introdução de microrganismos como agentes de biocontrole a diferentes fitopatógenos, com ação direta sobre o patógeno e/ou ativando os mecanismos de defesa da planta, tem sido alternativa promissora no manejo de doenças de plantas. Esse tipo de

microrganismo tem tido importante papel no controle de bactérias e de fungos fitopatogênicos, tanto utilizados isoladamente, por meio de pulverizações, como pela microbiolização de sementes como medida adicional aos tratamentos químicos (BEUX & DENARDIN, 2001; LUZ, 2001a; LUZ, 2001b; LUZ, 2003; AGOSTINI, 2004; TEDESCO, 2005; SBALCHEIRO, 2006; ZANATTA et al., 2007; CORREA et al, 2008).

O presente trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial de dois agentes de biocontrole previamente selecionados *in vitro*, através da microbiolização de sementes e aplicação na parte aérea da planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Fitobacteriologia e casa-de-vegetação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo. As sementes utilizadas foram das cultivares suscetíveis CD 214 RR e BRS 244 RR safra 2007/2008.

2.1 Preparo dos biocontroladores para microbiolização das sementes

Colônias puras dos biocontroladores UPF035 e UPF096 crescidas durante 48 hs em meio de cultura 523 de Kado, foram ressuspendidas em 5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%). A seguir retirou-se 1,0 mL dessa suspensão que foi adicionada em 50 mL de meio líquido 523 de Kado & Heskett (1970), sendo incubado a

28 °C e agitação orbital durante 48 h. Após foram preparadas suspensões de cada isolado em concentrações ajustadas para $OD_{540} = 0,3$. A microbiolização das sementes constituiu da adição de 3,5 mL de cada isolado que foram adicionadas em sacos plásticos, com capacidade para 5 L, seguido das sementes de soja. Para a testemunha foi colocada 3,5 mL de solução fisiológica. Para a completa microbiolização os sacos foram fechados e agitados suavemente por 10 minutos. Após foram mantidos em câmara de fluxo laminar por 3 h. Posteriormente, procedeu-se a semeadura.

Os tratamentos foram os seguintes:

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de sementes tratadas com solução fisiológica;

Tratamento 2 (T2): sementes com inoculação do patógeno;

Tratamento 3 (T3): sementes sem inoculação do patógeno e microbiolizadas com biocontrolador UPF035;

Tratamento 4 (T4): sementes sem inoculação do patógeno e microbiolizadas com biocontrolador UPF096;

Tratamento 5 (T5): sementes com inoculação do patógeno e microbiolizadas com biocontrolador UPF035;

Tratamento 6 (T6): sementes com inoculação do patógeno e microbiolizadas com biocontrolador UPF096.

2.2 Aplicação dos biocontroladores na parte aérea da planta

Colônias puras dos biocontroladores UPF035 e UPF096 crescidas durante 48 h em meio de cultura 523 de Kado, foram ressuspendidas em 5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%). A

seguiu retirou-se 1,0 mL dessa suspensão que foi adicionada em 50 mL de meio líquido 523 de Kado, sendo incubado a 28 °C e agitação orbital durante 48 h. Após foram preparadas suspensões com solução fisiológica de cada isolado em concentrações ajustadas para $OD_{540} = 0,3$.

A aplicação dos biocontroladores na parte aérea das plantas foi realizada por aspersão em toda parte aérea da planta até o ponto de escorrimento. O controle consistiu na aspersão de solução fisiológica, para simular as mesmas condições.

Os tratamentos foram os seguintes:

Tratamento 1 (T1 - controle): constituído de plantas aspergidas com solução fisiológica;

Tratamento 2 (T2): plantas com inoculação do patógeno;

Tratamento 3 (T3): plantas sem inoculação do patógeno com aplicação na parte aérea do biocontrolador UPF035;

Tratamento 4 (T4): plantas sem inoculação do patógeno com aplicação na parte aérea do biocontrolador UPF096;

Tratamento 5 (T5): plantas com inoculação do patógeno com aplicação na parte aérea do biocontrolador UPF035;

Tratamento 6 (T6): plantas com inoculação do patógeno com aplicação na parte aérea do biocontrolador UPF096.

2.3 Instalação dos experimentos em casa-de-vegetação

Para a instalação dos experimentos em casa-de-vegetação, foram proporcionadas condições artificiais de ambiente para favorecer

o desenvolvimento da doença. As sementes foram semeadas em vasos preenchidos com 3 kg de substrato.

2.4 Inoculação do patógeno

A inoculação do patógeno deu-se quando as plantas estavam com o 3º par de trifólios. Esta foi realizada por seccionamento do limbo foliar com tesoura esterelizada, a qual a cada corte da folha era embebida em suspensão ajustada para $OD_{540} = 0,2$ de *Pseudomonas savastanoi pv. glycinea*. O controle foi realizado com a tesoura embebida em solução fisiológica.

2.5 Avaliação

A avaliação foi feita 10 dias após a inoculação do patógeno, o tamanho da lesão foi mensurado em mm com auxílio digital paquímetro, em cada corte foram efetuadas 2 medidas totalizando 12 medidas por trifólio. O delineamento experimental para os dois experimentos foi inteiramente casualizado, cada tratamento foi representado por quatro repetições, em cada repetição foram mensuradas 3 trifólios.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de médias Duncan a 5% de probabilidade (CANTERI et al, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento I, no qual as sementes foram microbiolizadas com dois agentes de biocontrole, observou-se que os tratamentos diferiram estatisticamente em relação ao tamanho da lesão pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (Tabela 1).

As plantas da cultivar CD 214 RR inoculadas somente com o patógeno (T2), apresentaram maior tamanho de lesão, diferindo-se estatisticamente dos tratamentos 5 e 6 que continham biocontroles microbiolizados nas sementes. Sugerindo-se que os isolados apresentam potencial de biocontrole contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* mesmo quando microbiolizadas nas sementes. Sendo que, plantas originárias de sementes microbiolizadas com o biocontrolador UPF096 (T6), apresentaram lesões menores que a testemunha (T2), uma diminuição de 55%, diferindo do tratamento 5, semente microbiolizada com UPF035 oriundo de solo nativo que apresentou 43% de diminuição da lesão em comparação com a testemunha.

Tabela 1 – Tamanho da lesão em mm em sementes de soja cv. CD 214 RR e cv. BRS 244 RR microbiolizadas com dois biocontroles UPF035 e UPF096.

Tratamentos	Cultivares	
	CD 214	BRS 244
T1	0,06 d	0,05 d
T2	2,79 a	1,81 a
T3	0,33 d	0,38 d
T4	0,29 d	0,36 d
T5	1,60 b	0,95 c
T6	1,25 c	1,40 b
C.V (%)	16,19	31,37

***Tratamentos:** T1 = controle, T2 = sementes inoculadas com patógeno, T3 sementes sem inoculação do patógeno e microbiolizadas com UPF035, T4 = sementes sem inoculação do patógeno e microbiolizadas com UPF096, T5 = sementes com inoculação do patógeno e microbiolizadas com UPF035, T6 = sementes com inoculação do patógeno e microbiolizadas com UPF096.

Verifica-se, entretanto que o tratamento 5, com o isolado UPF035 o potencial de biocontrole da bactéria causadora do crestamento bacteriano da soja foi cerca de 48%, enquanto o agente de biocontrole UPF096 (T5) porporcionou 23% de controle.

Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Corrêa (2007), que avaliou os isolados DFs093 (*Bacillus sp.*), DFs513 (*Pseudomonas veronii*), DFs769 (*Bacillus cereus*), DFs842 e DFs831 (*Pseudomonas sp.*), DFs843 e DFs912 (*Rhodococcus sp.*) e as combinações M01 (DFs93+769+831) e M02 (DFs093+769+842) previamente selecionados para *Xanthomonas axonopdis* pv. *phaseoli*, através da microbiolização destes em 10 diferentes cultivares de feijão. O patógeno foi inoculado com tesoura imersa na suspensão. As porcentagens de controle encontradas para severidade variaram de 0 a 80%, com média de 33,4%. Para incidência, ocorreram variações de 0

a 90%, com média de 32,1%. Todos os tratamentos testados proporcionaram controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

Na aplicação dos biocontroladores nas sementes através da microbiolização observou-se que o tratamento 5, apresentou maior potencial de biocontrole cerca de 52 %.

Ludwig & Moura (2007) avaliaram o efeito de oito isolados bacterianos de *Pseudomonas synxatha*, *P. fluorescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. e *Stenotrophomonas malthophilia* microbiolizados em sementes da cultivar El Passo L144 para controle da queima-das-bainhas do arroz, causada por *Rhizoctonia solani*. Foram realizados três ensaios, sendo que no primeiro foi possível selecionar três isolados como promissores, *Pseudomonas synxatha*, *P. fluorescens*, DFs 306 (isolado de sementes de cebola) com reduções na severidade da doença atingindo 50, 33,3 e 16,7%, respectivamente. Estes isolados foram utilizados nos ensaios posteriores, em casa de vegetação e conduzidos até o ponto de colheita, onde foi possível observar o efeito biocontrolador do isolado *P. fluorescens* (DFs223), com reduções significativas na severidade da doença chegando a 88 e 91,7% no segundo e terceiro ensaios respectivamente.

Santos et al. (2006), investigaram o controle biológico da bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* através da microbiolização das sementes com 4 isolados de *Bacillus* spp, que produziram compostos ativos quando testados *in vitro* contra o patógeno. O tratamento com o líquido fermentado em sementes previamente infectadas pela bactéria alvo, permitiu avaliar a eficiência *in vivo* das quatro linhagens de *Bacillus* spp no controle da mancha aquosa. Destacando-se o isolado *B. megaterium* pv. *cerealis* que reduziu a

incidência da doença em 89% e a severidade da mancha aquosa em 92,7%.

Houve diferença no tamanho da lesão da *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* nas testemunhas das cultivares, a fitobactéria demonstrou-se mais agressiva na cv. CD 214 RR, esse fato pode ser devido à existência de genes de resposta a *Psg* diferentes entre as cultivares (VAN DER PLANK, 1978).

Tabela 2 – Tamanho da lesão em mm em sementes de soja cv.CD214 RR e BRS 244 RR com aplicação de dois biocontroles na parte aérea.

Tratamentos	Cultivares	
	CD 214	BRS 244
T1	0,06 c	0,05 b
T2	2,79 a	1,81 a
T3	0,29 c	0,28 b
T4	0,18 c	0,21 b
T5	1,72 b	1,63 a
T6	1,67 b	1,53 a
C.V (%)	15,95	29,25

***Tratamentos:** T1 = controle, T2 = plantas inoculadas com patógeno, T3 plantas sem inoculação do patógeno e aspergidas com UPF 035, T4 = plantas sem inoculação do patógeno e aspergidas com UPF 096, T5 = plantas com inoculação do patógeno e aspergidas com UPF 035, T6 = plantas com inoculação do patógeno e aspergidas com UPF 096.

Quando os biocontroles foram dispensados na parte aérea (Tabela 2), na cultivar CD 214 RR, os tratamentos 5 e 6 diferiram do tratamento 2, com isso pode-se constatar um controle da doença em torno de 38% e 40% respectivamente. No cultivar BRS 244 RR, os tratamentos 5 e 6 foram iguais estatisticamente ao tratamento 2,

sugerindo-se que os agentes de biocontrole UPF035 e UPF096 não foram efetivos contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* nesse cultivar.

Os tratamentos 3 e 4 nos dois experimentos, tiveram comportamento estatisticamente iguais ao T1, resultantes da inoculação somente com solução fisiológica comportando-se estatisticamente iguais nas duas cultivares.

Garcia et al. (2008), testou 5 bactérias pré-selecionadas em outros patossistemas, *Bacillus cereus* UFV-172 e UFV-75 isoladas de filoplano de feijoeiro, *Pseudomonas putida* UFV-053 isolada de rizosfera de feijoeiro, *B. cereus* UFV 101 isolada de filoplano de tomateiro contra a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*). As plantas de feijoeiro cv. Pérola tiveram seu filoplano atomizados com as suspensões dos antagonistas, após 48 horas, as plantas foram inoculadas por atomização com uma suspensão da fitobactéria. Os cinco antagonistas independente da origem do isolamento reduziram a severidade do crestamento bacteriano em comparação com o controle.

Maketon et al. (2008), investigaram a capacidade de biocontrole de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harsianum*, sozinhos e em combinação, para três patógenos do fumo, *Ralstonia solanacearum*, *Pythium aphanidermatum* e *Cercospora nicotiana*, quando testados em combinação demonstraram capacidade de controle dessas doenças.

De um modo geral, os biocontroladores UPF 035 e UPF 096 apresentaram antagonismo *in vivo*, tanto via microbiolização como via parte aérea contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

Ressalta-se que embora os isolados sejam oriundos de hospedeiros diferentes UPF 035 (sementes de algodão) e UPF 096 (rizosfera de papua), os mesmos apresentaram eficácia no patossistema estudado.

4 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Os biocontroladores UPF035 (obtido de sementes de algodão e UPF096 (oriundo de rizosfera de papuã), demonstraram potencial para exercer controle do crestamento bacteriano nas cultivares de soja CD 214 RR e BRS 244 RR.
- Houve diferença na performance dos biocontroladores frente a *Psg*.
- Observou-se resposta de defesa diferenciadas para as cultivares utilizadas nesse estudo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os procariotos isolados de diferentes nichos de várias espécies de plantas demonstraram *in vitro* demonstraram potencial de controle contra a bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

Os isolados UPF035 e UPF096 quando microbiolizados em sementes de soja reduziram significativamente a incidência de vários fungos indicando que futuramente estudos devem ser conduzidos com os isolados, sendo utilizados sozinhos, em combinações ou em formulações possam promover um maior controle podendo ser aplicados no tratamento de sementes.

Esses mesmos isolados quando testados em casa-de-vegetação apresentaram capacidade de controle biológico do cretamento bacteriano da soja.

Após verificar que há variações de cultivares nas reações de cultivares frente a *Psg* fica a sugestão que seja aumentado o espectro de cultivares nos próximos estudos.

Sugere-se que os estudos futuros com esses agentes de biocontrole sejam realizados a campo para confirmação da capacidade de biocontrole contra *Psg*.

Estudos devem ser conduzidos com os biocontroles isoladamente e em combinações, e em diferentes formulações para averiguar a real efetividade desses contra patógenos de plantas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, V. K. & SINCLAIR, J. B. *Principles of seed Patology*. Boca Raton, CRC Press, v.2, 1987.

AGOSTINI, V. A. *Biocontrole de Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli var. fuscans através da microbiolização de sementes de feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)*. 2004. Dissertação (Mestrado). Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2004.

AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. 4.ed. Florida EUA: Universidade da Florida, 1997 635p.

ALMEIDA, A. M. et al. Doenças da soja. In: KIMATI, H. et al. (Eds.). *Manual de Fitopatologia*, vol. 2. Doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p.569-588.

ALVES, R. C. & DEL PONTE, E. M. Crestamento bacteriano da soja. In: Del Ponte, E.M. (Ed.) *Fitopatologia.net - herbário virtual*. Departamento de Fitossanidade. Agronomia, UFRGS. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/agronomia/fitossan/herbariovirtual/ficha.php?id=101>>. Acesso em: 02 ago 2007.

ANDREOLA, F. & FERNANDES, S. A. P. A microbiota do solo na agricultura orgânica e no manejo de culturas. In: SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. S. (Eds.). *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. p. 21-37.

ANDREWS J. H & HARRIS R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol.*, v. 38, p. 145-180, 2000.

AZEVEDO, J.L. *A pesquisa agropecuária no Brasil*. Série Ciência & Tecnologia no Brasil, Escola de Administração de Empresas de São Paulo/FVG, 1993. 63p

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 30, n. 8/9, p. 1225-1228, 1998.

BENCHIMOL, R. L.; CHU, E. Y.; MUTO, R. Y.; DIAS-FILHO; M. B. Controle da fusariose em plantas de pimenta do reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas fisiológicas. *Pesq. agropec. bras.* Brasília, v. 35, n.7. p. 1343-1348, 2000.

BETTIOL, W. (Org.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. 388p.

BEUX, E. & DENARDIN, N. D. Uso de bactérias antagonistas no controle "in vitro" de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 34, 2001, São Carlos-SP: SBF. *Resumos...* Ed. Piracicaba, 2001. p. 303.

BORÉM, A. Escape gênico: os riscos do escape gênico da soja no Brasil. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v.10, p. 101-107, 1999.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v.1. n. 2. p. 18-24, 2001.

CHEN, L.; MCCORMICK, S.O.; HOHN, TM. Altered Regulation of 15-Acetyldeoxynivalenol production in *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore.v.66, p.2062-2065 2000.

CNPMA (Centro Nacional de Pesquisa do Meio Ambiente). *Jornal do Endofítico*. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/mat_jnvitro.html>. Acesso em: 20 abr. 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB.
Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 03 de jan. 2008.

CORREA, B. O. et al. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletrichum Lindemuthianum* (Saac e Magn). *Rev. bras. Sementes*. Pelotas, v.30, n.2, p. 156-163. 2008.

DÉFAGO, G. et al., Supression of black root rot of tobacco by *Pseudomonas* strain: potential application and mechanisms. In: HORNBY, D.; COOK, R.J.; HEINS, Y. (Eds.) *Biological control of soil-borne plant pathogens*. Wallingford: CAB International, 1990. p.93-108.

DENARDIN, N.D. & FREIRE, J. R. J. Assessment of polymers for the formulation of legume inoculants. *Word Journal of Microbiology & Biotechnology*, Oxford, v.16, n.3, p. 215-217, 2000.

DUNLEAVY, J. M.; WEBER, C. R.; CHAMBERLAIN, D. W. A source of bacterial blight resistance for soybean. *Iowa Academy Sciences Proceedings*, v.67, p.120-125, 1960.

EMBRAPA SOJA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
Disponível em:
<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/fontes/sojaCentralBrasi12003/doenca.htm>>. Acesso em 11 set. 2007.

FERRAZ, H. G. M.; ROMEIRO, R. S.; GARCIAL, F. A. de O.; SOUZA, A. N. de. Biocontrole da mancha-alvo do tomateiro por *Bacillus cereus* em função do modo de dispensa na planta. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. v. 2, n. 2. p.33-37, 2008.

FREITAS, S.S. & PIZZINATTO, M.A. Interações de *Pseudomonas* sp. e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* na rizosfera de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). *Summa Phytopathologica*, v. 17, n. 2, p. 105-112, 1991.

FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D. da; FREITAS, S. S. (Eds.). Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônomo, 2007. p. 01-20.

GARCIA, F. A. O. *Biocaracterização de procariotas como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotoras de crescimento em feijoeiro*. 2008. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

GAVA, C. A. T.; PEREIRA, J. C.; FERNANDEZ, M. C.; NEVES, M- C. P. Seleção de isolados de estreptomicetos para controle de *Ralstonia solanacearum*. *Pesq. Agropec. bras*, Brasília, v. 37, n.10. p. 1373-1380, 2002.

GOMES, P: *A soja*. São Paulo: Nobel, 1990. 5ª ed. 152p.

GRIGOLETTI JUNIOR, A. ; SANTOS, A. F. dos; AVER, C. G. Perspectivas do uso do controle biológico contra doenças florestais. *Revista Floresta*. v. 30, n. 2 p. 155-165, 2000.

HALFELD- VIEIRA, B. A Bactérias residentes do filo plano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002

HALFELD- VIEIRA, B. A; ROMEIRO, R. S.; MOUNTEER, A.; MIZUBUTI, E. S. G. Efficiency of phylloplane bactéria in controlling aerial tomato diseases under field conditions. *Summa Phytopathologica*. Botucatu, v.34, n.1.p. 86-87, 2008

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal Microbiology*.v. 43. p. 895-914, 1997.

HARTMAN, G.L. et al. (Eds.). *Compendium of soybean diseases*. The American Phytopathological Society: APS Press, 1999. 100p.

HASSE, G. *O Brasil da Soja – Abrindo fronteiras, semeando cidades*. Porto Alegre: editora L&PM, 1996.

HENNING, A. A. et al. *Manual de identificação de doenças da soja*. Londrina: Embrapa soja, 2005.

HUNGRIA, M.& CAMPOS, R. J. Fixação Biológica no Brasil é um exemplo de sucesso. *Revista Visão Agrícola*. Escola Superior de Agricultura, v.5, 2006.

KADO, C. I. & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. St. Paul, v. 60, p 24-30, 1970.

KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. *Plant Disease*,v.64. p. 24-30, 1980.

KHUN, O. J., PASCHOLATTI, S. F.; CARDOSO-FILHO, J. A.; PORTZ, R. L.; OSWALD,W. Indução de resistência sistêmica em plantas: Aspectos gerais , efeitos na produção e sobre microrganismos não alvos.

KLOEPPER, J. W.; MCINROY, J. A.; BOWEN,K. L. Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachnis hypogaea* L.). *Plant and Soil*, v. 139. p. 85-90, 1992.

LABANCA, E. R. G. *Purificação parcial de elicitores presentes em Saccharomyces cerevisiae: atividade como indutores de resistência em pepino (Cucumis sativus) contra Colletotrichum lagenarium e da síntese de gliceolinas em soja (Glycine max)*. 2002. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LIMA, J. L. Seleção de actinomicetos para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de plantas de tomateiro, 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2003.

LUCON, C. M. M. & MELO, I. S. Seleção de rizobactérias antagonistas a *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica, em tubérculos de batata. *Summa Phytopathologica*, v. 25, p. 132-136, 1999.

LUDWIG, J. & MOURA, A. B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, n. 5. p. 381-386. 2007.

LUZ, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Planta RAPP*, Passo Fundo, v.1. p. 33-77, 1993.

_____. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas Rapp*, Passo Fundo, v. 4. p. 1-49, 1996.

_____. Efeito de bioprotetores em patógenos de sementes e na emergência e rendimento de grãos de milho. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.26, p. 16-20, 2001a.

_____. Evaluation of plant growth-promoting and bioprotecting rhizobacteria on wheat crop. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 597-600, 2001b.

_____. Biological and chemical treatment combinations for seed. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.28, p. 37-40, 2003.

_____. *Microbiolização uma comparação com o tratamento químico no controle dos principais patógenos das sementes de trigo.*

Disponível em <[http://webnotes.sct.embrapa.br/pab/pab.nsf/ecd4ca3ff88efcfa03256cd004ea083/dbf84f5b5053577483256633007c5580/\\$FILE/Pab%20especial%207.doc](http://webnotes.sct.embrapa.br/pab/pab.nsf/ecd4ca3ff88efcfa03256cd004ea083/dbf84f5b5053577483256633007c5580/$FILE/Pab%20especial%207.doc)>. Acesso em: 26 out. 2007.

MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.39, p. 296-300, 2008.

MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico de patógenos de planta. *Revisão Anual de Patologia de Plantas Rapp*, Passo Fundo, v.1, p.369-409, 1993.

MARIANO, R. L. R. (Coord.) Manual de práticas em fitobacteriologia. Recife: Editora Universitária - UFPE, 2000. 171p.

MARIANO, R. L. R et al.; Biocontrole de doenças de plantas. In: TORRES, J. B. & MICHEREFF, S. J. (Eds). *Desafios do manejo integrado de pragas e doenças*. Recife: UFRPE, 2000. p. 78-111.

MELO, I. S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas Rapp*, Passo Fundo, v.4. p. 261-295, 1996.

_____. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Controle Biológico*. v.1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 1998. p. 17-67.

MENTEN, J. O. M. Prejuízos causados por patógenos associados às sementes. In: MENTEN, J.O.M. *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. São Paulo: Ciba Agro. 1995. p. 115-136.

_____. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4., 1996, Gramado, RS. *Anais...* 1996. p. 3-23.

MORAES, M.H.D. Testes de sanidade de sementes em rotina no Brasil: situação atual, contribuições e perspectivas. In: MENTEN, J.O.M. *Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico*. São Paulo: Ciba Agro, 1995. p. 37 - 51.

MOURA, A. B. & ROMEIRO, R. S. Avaliação *in vitro* de actinomicetos como antagonistas a *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896). *Cienc. e Agrotec.*Lavras, v. 23. n.2. p. 281-288, 1999.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.; PAULITZ, T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.50, n. 5, p. 301-320, 1997.

MUKHOPADHYAY, N.K.; GARRISON, N.K.; HINTON, D.M.; BACON, C.W.; KHUSH, G.S.; PECK, H.D.; DATTA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. *Mycopathologia*, v.134, p.151-179, 1996.

NANDAKUMAR, R. et al. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 33, p. 603-612, 2001.

NEHL, D. B.; ALLEN, S. J.; BROWN, J. F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*. v.5. p. 1-20, 1996.

PELCZAR JR; J. M.; et al. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. v.2. São Paulo: Makron Books, 1997.

PESSOA, M. N. G.; CORREIA, J. L. A.; VIANA, F. M. P.; MOTA, J. C. de O. Emprego de microrganismos obtidos de húmus de minhoca no controle de *Myrothecium roridum* "in vitro" e em sementes de

melão. *Summa Phytopathologica*. Botucatu, v.30, n.2. p. 238-242, 2004.

PRAMER, D.& SCHIMIDT, E. L. *Experimental soil microbiology*. Minnessota: Burges Publishing Company, 1964.

REMUSKA, A. C. & DALLAPRIA, M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. *Publ. UEPG Ci. Exatas Terra*. Ponta Grossa, v.13, n.3, p.31-36, 2007.

ROMEIRO, R. S. *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa: UFV, 1995.

_____, *Bactérias Fitopatogênicas*. 2 ed. Viçosa: UFV, 2005.

_____.; GARCIA, F. A. de O. Controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas Rapp*, Passo Fundo, v. 11, p. 195-227, 2003.

_____. Controle biológico de doenças de plantas. Procedimentos. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 176p.

SABARATNAM, S. & BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728 and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, n. 2, p. 1220-1228, 2003.

SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTO-MAIOR, A. M. Controle biológico da mancha-aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4. p.376-378, 2006.

SBALCHEIRO, C. C. *Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.)*. 2006. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

SCHAAD, N. W., JONES, J. B., CHUN, W. (Eds). *Laboratory guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3. ed. APS: St Paul, 2001. p. 373.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofítica com ação antagônica a fitopatógenos. *Sientia Agraria*. Curitiba, v. 9, n. 4. p. 535-538, 2008.

SILVA, H. S. A. et al.; *Microrganismos endofíticos: potencial de uso como agentes de biocontrole da ferrugem do cafeeiro*. Disponível em: <<http://www.repdigital.cnptia.embrapa.br/handle/CNPMA/7434>>. Acesso em: 24 ago. 2006.

SILVA, J. R. C.; SOUZA, R. M. de; ZACARONE, A. B.; SILVA, L. H. C. P.; CASTRO, A. M. S. Bactérias endofíticas no controle *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, agente da pinta bacteriana do tomateiro. *Cienc. agrotec.* Lavras, v. 32, n. 4. p. 1062-1072, 2008.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V.; MAGALHÃES JÚNIOR, H.; CAMPOS, J.R.; CASTRO, R.M.; CASTRO, A.M.S. Épocas e modo de aplicação do ativador de plantas benzothiadizole (BTH) na proteção contra a mancha bacteriana em tomateiro. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.8, p.375-376, 2000 (Suplemento).

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

SINCLAIR, J. B. & BACKMAN, P. A. (Eds.) *Compendium of Soybean Diseases*. 3rd ed. St. Paul: *American Phytopathological Society*, 1989.

SIQUEIRA, J. O. et al. *Microrganismos e processos biológicos do solo - perspectiva ambiental*. EMBRAPA- Brasília-DF, 1994. 142p.

SMITH, D. & ONIONS, A. H. S. The preservation and maintenance of living fungi. 2^a ed. Wallingford: CAB INTERNATIONAL. 1994. 122p.

SOBRAL, J. K. *A comunidade endofítica e epifítica de soja (Glycine Max) e estudo da interação endofíticos planta*. 2003. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

SOTTERO, A. N.; FREITAS, S. dos S.; MELO, A. M. T.; TRANI, P. E. Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, v.30, n.2, p. 225-234, 2006.

STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. *Plant and Soil*. v.175, p. 257-263, 1995.

_____.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, v. 35. p 13-19, 1997

_____.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G. Association of bacterial endophytic populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 44. p. 162-167, 1998.

TUMELEIRO, A.I.; DENARDIN, N.D. Uso de Polímeros em Formulações para Preservação de *Pectobacterium atrosepticum* e *Ralstonia solanacearum*. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1, p.58-61, 2008

VAN DER PLANK, J. E. *Disease resistance in plant*. New York: Academic Press, 1968. 206p.

VAN LOON, L. C., BAKKER P. A. H. M.: PIETERSE C. M. J.

Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. v. 36, p. 453-483, 1998.

YEN, G. Y.; STEADMAN, D. T., LINDGREN, D.; SCHAFF, D.; JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Protection*. v. 20, p.395-402, 2001.

YORINORI, J. T. Controle integrado das doenças de soja. In: CAMARA, G.M.S. *Soja: tecnologia e produção II*. Piracicaba. Esalq, 2000. p. 203-221

ZANATTA, Z. G. C. N.; MOURA, A. B.; MAIA, L. C.; SANTOS, A. S. dos. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). *Braz. J. Microbiol.* São Paulo, v.38, n.3, p. 511-515, 2007.

ZORATO, M. de F.; HOMECHIN, M. & HENNING, A.A. Efeitos da assepsia superficial com diferentes agentes químicos na incidência de microorganismos em sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, Campinas, v. 23, n. 1, p. 159-166, 2001.