

# Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas

**Editores**

**Wagner Bettiol  
Marcelo A. B. Morandi**

*FundAg*  
FUNDAÇÃO DE APOIO À PESQUISA AGRÍCOLA

*Embrapa*

## **República Federativa do Brasil**

*Luiz Inácio Lula da Silva*  
Presidente da República

### **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

*Reinhold Stephanes*  
Ministro

### **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

#### **Conselho de Administração**

*José Gerardo Fontelles*  
Presidente

*Pedro Antonio Arraes Pereira*  
Vice-Presidente

*Murilo Francisco Barella*  
*Derli Dossa*  
*Antonio Salazar Pessoa Brandão*  
*Aloisio Lopes Pereira de Melo*  
Membros

#### **Diretoria-Executiva**

*Pedro Antonio Arraes Pereira*  
**Diretor-Presidente**

*José Geraldo Eugênio de França*  
*Kepler Euclides Filho*  
*Tatiana Deane de Abreu Sá*  
Diretores-Executivos

#### **Secretaria de Gestão e Estratégia**

*Luiz Gomes de Souza*  
Chefe

#### **Embrapa Meio Ambiente**

*Celso Vainer Manzatto*  
Chefe-Geral

*Adriana Marlene Moreno Pires*  
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

*Heloisa Ferreira Filizola*  
Chefe-Adjunto de Comunicação e Negócios

*Emerson José Lourenço*  
Chefe-Adjunto de Administração

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Meio Ambiente  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas**

**Editores Técnicos**

**Wagner Bettiol  
Marcelo A. B. Morandi**

Embrapa Meio Ambiente  
Jaguariúna, SP  
2009

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente  
Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho  
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP  
Fone: (19) 3311-2600 Fax: (19) 3311-2740  
sac@cnpma.embrapa.br  
www.cnpma.embrapa.br

### **Comitê de Publicação da Unidade**

Presidente: Ariovaldo Luchiari Júnior  
Secretário-Executivo: Luiz Antonio Silveira Melo  
Bibliotecária: Maria Amélia de Toledo Leme  
Membros: Heloisa Ferreira Filizola, Ladislau Araújo Skorupa, Cláudio Martin Jonsson, Lauro Charlet Pereira, Adriana Marlene Moreno Pires, Emília Hamada e Nilce Chaves Gattaz  
Normalização Bibliográfica: Maria Amélia de Toledo Leme  
Editoração Eletrônica: Quebra-Cabeça - Soluções em Artes Gráficas (qcartesgraficas@terra.com.br)  
Capa: Silvana Cristina Teixeira Estevão

### **1ª edição**

(2009)

Nota:

"Os trabalhos aqui publicados não foram revisados tecnicamente pelo CLP da Embrapa Meio Ambiente, como normalmente se procede para as publicações regulares. Assim sendo, todos os conceitos e opiniões emitidas são de inteira responsabilidade dos autores".

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no seu todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

---

Bettiol, Wagner

Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas / Editado por Wagner Bettiol e Marcelo Augusto Boechat Morandi. -- Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2009.

341 p.

ISBN 978-85-85771-48-5

1. Controle biológico. 2. Doenças de plantas. I. Morandi, Marcelo Augusto Boechat. II. Título.

632.96 CDD 21

---

© Embrapa 2009

# Prefácio

A IX Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas com o tema "Biocontrole de doenças de plantas no Brasil: uso e perspectivas", organizada pela Embrapa Meio Ambiente, foi realizada entre 06 e 09 de novembro de 2007 em Campinas, SP. Palestras sobre impactos das mudanças climáticas globais sobre o controle biológico, comercialização de agentes de biocontrole, utilização de resíduos orgânicos na indução de supressividade de solo, a situação das indústrias de controle biológico, a utilização de controle biológico para grandes culturas, bactérias como ferramentas para o manejo de doenças e integração de métodos biológicos para o controle de doenças em diversas culturas foram apresentadas por especialistas brasileiros e estrangeiros. Além das palestras, foram apresentados numerosos trabalhos relatando experiências bem sucedidas de uso de agentes de biocontrole no Brasil e no exterior.

Essa publicação representa uma seleção das principais palestras e trabalhos apresentados no evento. Adicionalmente foram convidados especialistas em controle biológico da vassoura-de-bruxa, em indução de resistência em plantas por bactérias, controle biológico de plantas daninhas e potencial de óleos essenciais e de extratos vegetais para o controle de fitopatógenos para descreverem sobre as temáticas. Além disso, os editores incluíram um capítulo contendo aspectos sobre a história e a situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Didaticamente a publicação está dividida em duas sessões, sendo que a primeira trata de aspectos gerais do controle biológico e a segunda relata casos de sucesso no uso de agentes de biocontrole e sua integração com outros métodos.

Um dos objetivos da publicação é apresentar alternativas que colaborem na redução do uso de agrotóxicos por unidade de área, pois esse é um dos grandes problemas da agricultura mundial. Além disso, objetiva também estabelecer um marco da situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. Esperamos que o livro seja útil para os pesquisadores, professores, agricultores, engenheiros agrônomos e florestais, técnicos agrícolas, estudantes de graduação e pós-graduação, legisladores, indústrias de controle biológico e pessoas interessadas no biocontrole.

Nós agradecemos a colaboração dos palestrantes e dos convidados que redigiram os capítulos que compõe a publicação, pois a fizeram sem o objetivo financeiro. Agradecemos ainda à Maria Amélia Toledo Leme pela normatização das referências bibliográficas e à Maria Cristina Tordin pela colaboração na revisão da língua portuguesa. Agradecimento especial à Embrapa Meio Ambiente e à Fundag que desde o início da organização do evento sempre colaboraram decisivamente na sua realização.

A publicação da obra indica a finalização da organização da IX Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas.

**Wagner Bettiol & Marcelo A. B. Morandi**

Editores

# Sumário

## Sessão 1. Aspectos Gerais Sobre o Biocontrole de Doenças de Plantas

### Capítulo 1. Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil

Marcelo Augusto Boechat Morandi & Wagner Bettiol ..... 7

### Capítulo 2. A Indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microrganismos no Brasil

Rogério Biaggioni Lopes ..... 15

### Capítulo 3. Impactos das Mudanças Climáticas sobre o Controle Biológico de Doenças de Plantas

Wagner Bettiol & Raquel Ghini ..... 29

### Capítulo 4. Fish Emulsion and Liquid Swine Manure: Model Systems for Development of Organic Amendments as Fertilizers with Disease Suppressive Properties

George Lazarovits, Pervaiz A. Abbasi, Kenneth L. Conn, Janet E. Hill & Sean M. Hemmingsen ..... 49

### Capítulo 5. Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos

Tiago Domingues Zucchi & Itamar Soares de Melo ..... 69

### Capítulo 6. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos por Elicidores de Natureza Bacteriana

Reginaldo da Silva Romeiro & Flávio A. Oliveira Garcia ..... 85

### Capítulo 7. Controle Biológico de Plantas Daninhas com Fitopatógenos

Robert Weingart Barreto ..... 101

### Capítulo 8. Bioestimulantes e Protetores de Plantas Derivados de Macroalgas Marinhas

Viviane Talamini, Roberta Paulert & Marciel Stadnik ..... 129

### Capítulo 9. Óleos Essenciais no Controle Fitossanitário

Lília Aparecida Salgado de Moraes ..... 139

## Sessão 2. Uso de Agentes de Biocontrole e sua Integração com Outros Métodos

### Capítulo 10. Supressividade de Solo a *Meloidogyne* por *Pasteuria penetrans* nos Estados do Maranhão e Santa Catarina

Leandro Grassi de Freitas; Guilherme Silva de Podestá; Silamar Ferraz & Marcelo Magalhães Coutinho ..... 153

<b>Capítulo 11. Monitoramento de <i>Trichoderma atroviride</i> SC1 em um Vinhedo no Nordeste da Itália: Considerações sobre Impacto Ambiental e Controle Biológico de <i>Armillaria mellea</i></b>	
Claudia Maria Oliveira Longa, Federica Savazzini & Ilaria Pertot .....	173
<b>Capítulo 12. Supressividade a Fitopatógenos Habitantes do Solo</b>	
Wagner Bettiol; Raquel Ghini; Rosa R.L. Mariano; Sami J. Michereff; Liliana P. V. Mattos; Indira C. M. Alvarado & Zayame V. Pinto .....	187
<b>Capítulo 13. Resíduos Orgânicos e Solarização para o Controle das Doenças do Feijoeiro Causadas por <i>Sclerotium rolfsii</i></b>	
Idalmir dos Santos, Vanessa N. Tomazeli & Rafael G. F. Morales .....	209
<b>Capítulo 14. Controle da Podridão de Raiz e Promoção de Crescimento em Hidroponia com Bactérias</b>	
Élida Barbosa Corrêa & Wagner Bettiol .....	225
<b>Capítulo 15. Controle Biológico com <i>Trichoderma</i> em Grandes Culturas - Uma Visão Empresarial</b>	
Alan William Vilela Pomella & Rute Terezinha da Silva Ribeiro .....	239
<b>Capítulo 16. Controle Biológico da Vassoura-de-Bruxa do Cacauzeiro na Bahia</b>	
João de Cássia do Bomfim Costa, José Luiz Bezerra, Lindolfo P. Santos Filho, Marcelo de Carvalho Alves & Euvaldo Marques Moura .....	245
<b>Capítulo 17. Controle Biológico da Ferrugem do Cafeeiro</b>	
Luiz Antonio Maffia, Fernando Haddad & Eduardo S. G. Mizubuti .....	267
<b>Capítulo 18. Microrganismos Endofíticos como Agentes de Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro e de Promoção de Crescimento</b>	
Harllen S. A. Silva & Wagner Bettiol .....	277
<b>Capítulo 19. Controle Biológico de Doenças de Flores e Frutos Jovens de Citros</b>	
Katia Cristina Kupper .....	289
<b>Capítulo 20. Análise da Viabilidade Comercial de Produtos à Base de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus pumilus</i> para o Controle de Fitopatógenos no Brasil</b>	
Fabiana D'Agostino & Marcelo Augusto Boechat Morandi .....	299
<b>Capítulo 21. Controle Biológico de <i>Bipolaris oryzae</i> no Arroz Irrigado</b>	
Juliane Ludwig & Andréa Bittencourt Moura .....	317
<b>Capítulo 22. Integração de Métodos Físicos e Biológicos para o Controle de Doenças e Pragas em Lírio e Espatifilo</b>	
Johannes Petrus W. de Wit; Ronaldo Aluisio Kievitsbosh & Wagner Bettiol .....	331
<b>Capítulo 23. Integração de Métodos Físicos e Biológicos no Controle de Doenças em Viveiros de Plantas Medicinais: Estudo de Caso com <i>Cordia verbenacea</i></b>	
Marcelo Augusto Boechat Morandi .....	337

## Capítulo 1

# Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil

Marcelo Augusto Boechat Morandi & Wagner Bettiol\*

*Embrapa Meio Ambiente; CP 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil, mmorandi@cnpma.embrapa.br,  
bettiol@cnpma.embrapa.br. \*Bolsista do CNPq.*

## Introdução

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura, tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores; a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos princípios ativos dos agrotóxicos; o surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos); o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade entre outros. Por outro lado, a proteção de plantas por meio do uso de agrotóxicos, apresenta características atraentes, como a simplicidade, a previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema para a sua aplicação. Para o sucesso com a aplicação de um fungicida de amplo espectro é importante o conhecimento de como aplicar o produto, sendo necessária pouca informação sobre a ecologia e a fisiologia de espécies, interações biológicas, ecologia de sistemas e ciclagem de nutrientes entre outras (Bettiol & Ghini, 2003). Essa simplificação interessa basicamente à comercialização de insumos que interferem em muitas espécies e conseqüentemente desequilibram o sistema (Bettiol, 2008).

Entretanto, a preocupação da sociedade com o impacto da agricultura no ambiente e a contaminação da cadeia alimentar com agrotóxicos está alterando o cenário agrícola, resultando em mercados de alimentos produzidos sem o uso de agrotóxicos ou aqueles com selos que garantem que os agrotóxicos foram utilizados adequadamente. Esses aspectos estão fazendo com que a situação do uso dos agrotóxicos permeie a agenda ambiental de diversos países (Bettiol, 2008). Dentre as alternativas para a redução do uso de agrotóxicos o controle biológico é um dos mais discutidos, podendo tanto aproveitar o controle biológico natural quanto realizar a introdução de um agente de controle biológico.



Entretanto, apenas a substituição de um produto químico por um biológico não é a situação adequada, mas sim caminhar para o desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e, portanto, menos dependentes do uso de agrotóxicos. O conceito de agricultura sustentável envolve o manejo adequado dos recursos naturais, evitando a degradação do ambiente de forma a permitir a satisfação das necessidades humanas das gerações atuais e futuras (Bird *et al.*, 1990). Esse enfoque altera as prioridades dos sistemas convencionais de agricultura em relação ao uso de fontes não renováveis, principalmente de energia, e muda a visão sobre os níveis adequados do balanço entre a produção de alimentos e os impactos no ambiente. As alterações implicam na redução da dependência por produtos químicos e outros insumos energéticos e o maior uso de processos biológicos nos sistemas agrícolas (Bettiol & Ghini, 2003).

## Marcos Históricos do Controle Biológico de Doenças de Plantas no Brasil

A história do controle biológico de doenças no Brasil é relativamente recente e marcada por interrupções. De uma forma resumida os principais acontecimentos foram:

→ 1950 – Primeiro artigo publicado sobre o tema por Reinaldo Foster (Foster, R. 1950: Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. *Bragantia* 10: 139-148), pesquisador do Instituto Agrônomo de Campinas;

→ 1986/1987 – 1ª e 2ª Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, realizada em Piracicaba, SP, marcando a estruturação da área;

→ 1987 – Primeiro produto comercial disponibilizado – *Trichoderma viride* - para o controle de *Phytophthora cactorum* em macieira, disponibilizado pelo Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, da Embrapa e desenvolvido por Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza;

→ 1990 – Utilização de *Acremonium* para o controle da lixa do coqueiro pela Maguari SA, sendo o produto desenvolvido por Shinobu Sudo;

→ 1991 – Publicação do primeiro livro intitulado “Controle Biológico de Doenças de Plantas”, editado por Wagner Bettiol e publicado pelo então Centro Nacional de Pesquisa de Defesa da Agricultura, da Embrapa, atual Embrapa Meio Ambiente;

→ 1992 – Realização da primeira sessão exclusiva de apresentação oral de trabalhos sobre controle biológico de doenças de plantas num Congresso Brasileiro de Fitopatologia (XXV), realizado em Gramado, RS, sob coordenação do Dr. Wilmar Corio da Luz;

→ 1992 – Criada a primeira disciplina sobre “Controle biológico de doenças de plantas” no curso de pós-graduação em Proteção de Plantas, na UNESP/Botucatu por Wagner Bettiol;

- 1992 - Primeira empresa (BIOAGRO ALAM LTDA. incubada no Departamento de Fitossanidade na Faculdade de Agronomia – UFRGS) especializada na produção e comercialização de *Trichoderma*;
- 1997 – Publicação pelo IBAMA da portaria 131 de 03 de novembro de 1997 estabelecendo os critérios e procedimentos para efeito de registro e avaliação ambiental de agentes microbianos empregados na defesa fitossanitária;
- 2000 - produção de Tricovab® à base de *Trichoderma stromaticum* para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro pelo CEPEC/CEPLAC em Ilhéus, BA;
- 2007 - IX Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, realizada em Campinas, SP e criação da Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio);
- 2008 – Registro do primeiro fungicida biológico comercial contendo um antagonista para o controle de doenças de plantas – Trichodermil® (*Trichoderma harzianum*), pela Itaforte Bioprodutos Ltda.;
- 2009 – Mais de 20 marcas comerciais de produtos contendo agentes de controle biológico de fitopatógenos estão disponíveis para os agricultores;
- 2009 – Em vários cursos de pós-graduação em Fitopatologia é ministrada disciplina de controle biológico de doenças de plantas;
- 2009 - Aprovação pelo CNPq de projeto para determinação de metodologias e avaliação de qualidade dos produtos biológicos para o controle de doenças de plantas.

## Agentes de Biocontrole Disponíveis

No Brasil, diversos produtos biológicos estão disponíveis para utilização, dentre esses podem se citados: estirpes fracas de CTV para premunização contra a tristeza dos citros; estirpes fracas de PRSV-W para premunização contra o mosaico da abobrinha; *Hansfordia pulvinata* para o controle do mal-das-folhas da seringueira; *Acremonium* sp. para o controle da lixa do coqueiro; *Clonostachys rosea* para o controle do mofo cinzento; *Bacillus subtilis* para o controle de diversas doenças; *Trichoderma* spp. para o controle de patógenos de solo e substrato e da parte aérea. Detalhes sobre esses e outros produtos, inclusive para o controle de pragas, são discutidos por Bettiol (2003), Campanhola & Bettiol (2003a) e Bettiol *et al.* (2008). Dos agentes citados será discutido nesse capítulo, como exemplo, apenas a situação do uso de *Trichoderma*.

## *Trichoderma* spp. para o Controle de Patógenos de Solo e Substrato e da Parte Aérea

A primeira publicação sobre o uso de *Trichoderma* como agente de controle biológico de doenças de plantas no Brasil foi na década de 1950, quando Foster (1950) descreveu a inativação do vírus do mosaico do fumo (TMV) por filtrados da cultura de *Trichoderma* sp.

Neste estudo, o filtrado da cultura do antagonista reduziu em até 90% a capacidade infectiva do vírus, avaliada por meio do número de lesões locais em folhas de *Nicotiana glutinosa*.

Entretanto, somente em 1987, trinta e sete anos após a primeira publicação, um produto a base de *Trichoderma viride* foi usado comercialmente no Brasil contra a podridão de raízes e colo em macieira, causada por *Phytophthora cactorum* (Valdebenito-Sanhueza, 1991). O agente de controle biológico foi selecionado pela capacidade de colonizar o solo e proteger as mudas após o plantio. Nesta época, o antagonista foi multiplicado em grãos de sorgo e acondicionado em pequenos sacos plásticos contendo a dose recomendada para uma cova de macieira (24 g). Nos anos de 1989 e 1990, mais de 50.000 unidades do produto foram produzidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) e usadas no sul do Brasil.

A primeira empresa privada especializada na produção massal e comercialização de *Trichoderma* no Brasil iniciou as atividades em 1992, no estado do Rio Grande do Sul, com o nome de BIOAGRO ALAM LTDA. e incubada no Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Posteriormente, diversas outras empresas surgiram no mercado, existindo mais de uma dezena de produtos comerciais em uso no país.

*Trichoderma* é, sem dúvida, o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado e utilizado no Brasil e em outros países da América Latina (Bettiol *et al.*, 2008). Por exemplo, durante a IX Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, realizado em Campinas-SP, em novembro de 2007, 33% dos trabalhos apresentados abordavam o uso de *Trichoderma* como agente de controle biológico (Reunião..., 2008).

Em um levantamento realizado em abril de 2008 por Bettiol & Morandi (no prelo) foi caracterizada a situação do mercado de *Trichoderma* no Brasil. No estudo foram identificadas 13 empresas que produzem e comercializam *Trichoderma*, sendo que estão restritas a seis estados, principalmente no Centro-Sul do país (Figura 1). Todas as empresas utilizam a técnica de fermentação sólida em grãos de arroz, milho ou outros cereais, sendo o volume de produção em torno de 550 t/ano de grãos.

As formulações disponíveis no mercado incluem: pó-molhável; grânulos dispersíveis; suspensão concentrada; óleo emulsionável; grãos colonizados e esporos secos. *Trichoderma asperellum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma stromaticum* e *Trichoderma viride* são as principais espécies do agente de biocontrole comercializadas. Entretanto, em alguns produtos comercializados não há identificação das espécies.

No estudo foi verificado que entre os patógenos alvos, incluem, principalmente: *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Macrophomina*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Botrytis* e *Crinipellis*, para as culturas de feijão, soja, algodão, fumo, morango, tomate, cebola, alho, plantas ornamentais e cacau. Além destas, alguns produtos são recomendados para o tratamento de substratos e para o tratamento de sementes.



A situação da produção e comercialização do *Trichoderma* no Brasil ilustra o momento do controle biológico de doenças de plantas. Juntamente com esse antagonista outros estão em situação semelhante, mas com menor volume de produção.

## Considerações Finais

Apesar do enfoque ecológico expresso na legislação ambiental, a política agrícola nacional ainda encontra-se incipiente no que se refere à expansão de práticas agrícolas alternativas e ecologicamente sustentáveis. Não obstante a existência de um acervo de contribuições técnico-científicas em controle biológico de pragas e fitopatógenos, as iniciativas governamentais para o incentivo ao uso dessas práticas são ainda restritas (Campanhola & Bettiol, 2003b). Entretanto, o aumento do uso de técnicas alternativas, como foi o caso dos agrotóxicos que fizeram parte de um conjunto de tecnologias associadas ao processo de modernização da agricultura brasileira a partir da década de 60, depende da política pública para o setor. Assim, verifica-se que a despeito da crescente demanda da sociedade por produtos livres de resíduos de agrotóxicos e com menores impactos sobre os recursos naturais, ainda é pequeno o uso de agentes de controle biológico de doenças de plantas no Brasil (Campanhola & Bettiol, 2003b). A seguir são enumerados alguns aspectos que justificam este fato, sendo alguns discutidos também por Campanhola & Bettiol (2003c) e Bettiol *et al.* (2008) para o uso de métodos alternativos de controle fitossanitário.

→ É limitada a disponibilidade de produtos comerciais e de princípios ativos contendo agentes de controle biológico de doenças de plantas no Brasil, sendo que apenas parte desses produtos é devidamente registrada;

→ Existe uma experiência de resultados inconsistentes ao nível do campo, que tem gerado perda de credibilidade em sua ação. A ação, muitas vezes, lenta dos microrganismos gera desconfiança por parte de agricultores quanto a sua efetividade;

→ A utilização dos organismos exige, muitas vezes, cuidados especiais para o seu adequado manejo.

→ A qualidade dos produtos disponíveis nem sempre é adequada, o que colabora com as dificuldades em sua adoção em maior escala. A produção em larga escala dos agentes de biocontrole desenvolvidos no Brasil é realizada, em geral, com baixo nível tecnológico, pois a infra-estrutura para o desenvolvimento dos agentes de biocontrole é deficitária. A maioria dos produtos não é submetida a estudos rigorosos de pré-formulação, formulação e controle de qualidade;

→ A especificidade, uma das principais características dos produtos para controle biológico, é um fator que dificulta o investimento no seu desenvolvimento. Como normalmente um agente de controle biológico só é eficiente para um ou poucos patossistemas, o custo para o seu desenvolvimento e registro é proibitivo. Esse fator faz com que o produto final apresente custo elevado para os produtores;

→ A difusão dos conceitos e princípios envolvidos no controle biológico é deficiente. A maioria dos cursos de engenharia agrônômica e engenharia florestal não tem programas curriculares aplicados para o desenvolvimento e utilização de controle biológico. Além disso, ainda é limitada a consciência dos consumidores sobre os problemas de saúde pública e ambiental causados pelo uso intensivo de agrotóxicos e sobre as vantagens do controle biológico;

→ Como a assistência técnica oficial está relativamente desestruturada, a indústria de agrotóxicos tem um papel importante na assistência técnica aos produtores, o que dificulta a mudança de conceitos e a adoção do controle biológico por parte destes agricultores que seguem as práticas preconizadas pela agricultura moderna, dando continuidade à cultura do uso de agrotóxicos;

→ Dificuldade de registro dos agentes de biocontrole, pois a legislação é a mesma utilizada para os agrotóxicos;

→ Há poucos programas específicos para o financiamento de pesquisa e produção que permitam o desenvolvimento e a produção em larga escala dos produtos biológicos e não existem incentivos tributários para a produção e uso de agentes de controle biológico.

Entre as ações de pesquisa necessárias estão o entendimento dos mecanismos de ação envolvidos nas interações entre os agentes de biocontrole, os patógenos, as plantas e o ambiente. Além disso, os estudos de impacto ambiental dos agentes de biocontrole também são necessários para sua adoção de forma segura e controlada. São poucas as instituições de pesquisa e indústrias que tem se dedicado ao controle biológico, tanto no desenvolvimento de pesquisas, como no de produtos para viabilizar o uso comercial. Para uma maior adoção de produtos biológicos no controle de doenças de plantas, há a necessidade da intensificação no desenvolvimento de trabalhos de pesquisas direcionados às diversas etapas para a obtenção dos produtos.

Apesar das dificuldades, o mercado brasileiro de agentes de controle biológico de doenças de plantas tem crescido e se diversificado significativamente nos últimos anos. A adoção do controle biológico e de outros métodos alternativos na agricultura para o controle dos problemas fitossanitários vem recebendo uma colaboração marcante de um movimento crescente que é o da agricultura orgânica e de suas variantes, tais como: biodinâmica, natural, alternativa, sustentável e ambiental (Morandi *et al.*, 2005). Esses novos modelos de agricultura colaboram para a racionalização do uso de agrotóxicos e atendem às exigências de uma produção de alimentos saudáveis e com qualidade ambiental.

Como consequência do aumento da demanda por produtos biológicos tem-se verificado outro movimento que é o surgimento de um grande número de pequenas empresas que estão desenvolvendo esforços para colocar agentes de controle biológico no mercado. Se, por um lado, esta multiplicação de “produtos biológicos” sem validação científica e de qualidade às vezes duvidosa gera um problema de credibilidade no controle biológico, por outro gera uma oportunidade de integração da pesquisa com as empresas e o mercado. Tem sido frequente a busca dos pequenos empresários por parcerias e contratos para desenvolvimento e testes de seus produtos junto às instituições de pesquisa e Universidades.

Há iniciativas neste sentido, fomentadas por programas como o Programa de Inovação Tecnológica em Pequenas Empresas – PIPE, da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do SEBRAE, FINEP e outras fontes (Morandi *et al.*, 2005).

A recente organização da Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABCBio) e o avanço da legislação para registro e comercialização destes produtos têm impulsionado o mercado e tende a promover a organização e regularização da cadeia.

## Referências

- Bettiol, W. Controle de doenças de plantas com agentes de controle biológico e outras tecnologias alternativas. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 191-215.
- Bettiol, W. Conversão de sistemas de produção. In: Poltronieri, L.S. & Ishida, A.K.N. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle de Insetos-Praga, Doenças e Plantas Daninhas: Panorama atual e perspectivas. Belém. Embrapa Amazônia Oriental. 2008. pp. 289-308.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 79-95.
- Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. *Trichoderma* in Brazil: history, research, commercialization and perspectives. IOBC wprs Bulletin (no prelo).
- Bettiol, W.; Ghini, R.; Morandi, M.A.B.; Stadnik, M.J.; Kraus, U.; Stefanova, M. & Prado, A.M.C. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) Controle Microbiano de Pragas na América Latina – Avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008. pp. 303-331.
- Bird, G.W.; Edens, T.; Drummond, F. & Groden, E. Design of pest management systems for sustainable agriculture. In: Francis, C.A.; Flora, C.B. & King, L.D. (Eds.) Sustainable Agriculture in Temperate Zones. New York. John Wiley. 1990. pp. 55-110.
- Campanhola, C. & Bettiol, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003a. pp. 13-51.
- Campanhola, C. & Bettiol, W. Controle biológico de pragas e outras técnicas alternativas. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003b. pp. 97-163.
- Campanhola, C. & Bettiol, W. Situação e principais entraves ao uso de métodos alternativos aos agrotóxicos no controle de pragas e doenças na agricultura. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003c. pp. 267-279.
- Foster, R. Inativação do vírus do mosaico comum do fumo pelo filtrado de culturas de *Trichoderma* sp. *Bragantia* 10: 139-148. 1950.
- Morandi, M.A.B.; Bettiol, W. & Ghini, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Venzon, M.; Paula Jr, T.J. & Pallini, A. Controle Alternativo de Pragas e Doenças. Viçosa. Epamig/CTZM:UFV. 2005. pp. 247-268.
- Pomella, A.W.V. A utilização do controle biológico para grandes culturas – a experiência do grupo Sementes Farroupilha. *Summa Phytopathologica* 34: 195-196. 2008.
- Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 2007, Campinas, SP. *Summa Phytopathologica* 34 (supl.): 156-203. 2008.
- Valdebenito-Sanhueza, R.M. Possibilidades do controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: Bettiol, W. (Ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. pp. 303-305.

## Capítulo 2

# **A Indústria no Controle Biológico: Produção e Comercialização de Microrganismos no Brasil**

Rogério Biaggioni Lopes

*Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - CP 02372; 70770-900, Brasília, DF, Brasil,  
e-mail: rblopes@cenargen.embrapa.br*

## **Introdução**

O controle biológico de pragas e doenças constitui-se em um processo importante para atender a demanda, cada vez maior, de produtos e alimentos livres de resíduos deixados pelas aplicações de agrotóxicos. A sociedade vem pressionando os setores de produção na direção do aumento da oferta de alimentos mais saudáveis, a exemplo dos protocolos estabelecidos pelo mercado europeu que visam a segurança alimentar do consumidor. O Brasil e outros países, que tem na agricultura a base da sua economia, já sentem essa necessidade e começam a implantar sistemas mais sustentáveis de produção integrada, onde o controle biológico é ferramenta indispensável. Além da preocupação relacionada aos resíduos de agrotóxicos nos alimentos, a questão ambiental está diretamente associada a esse ensejo social de mudança do padrão químico convencional para métodos integrados de produção. A viabilidade econômica de um sistema de produção é um fator que afeta diretamente o agricultor e talvez deva ser o primeiro a ser considerado para a maior aceitação do controle biológico. Se existem viabilidade econômica e eficácia no método, existe também o estímulo para o agricultor usar o insumo biológico.

O conhecimento sobre microrganismos como agentes de controle de pragas e doenças de plantas remonta a centenas de anos. Contudo, o controle microbiano nas áreas da entomologia, que visa ao emprego de microrganismos no controle de insetos e ácaros, e fitopatologia, relacionada ao uso de antagonistas no controle de doenças de plantas, evoluiu de forma diferente.



Os primeiros indícios referentes às doenças dos insetos surgiram há quase 5.000 anos, quando as abelhas e o bicho-da-seda eram explorados pelos egípcios e chineses. Os ensinamentos básicos da patologia de insetos foram elaborados entre os séculos XVIII e XIX e ministrados por grandes cientistas como Agostino Bassi, Louis Pasteur e Réaumur. Nessa mesma época ocorreram também as primeiras aplicações de vírus e fungos para o controle de insetos (Alves, 1986/1998). Uma das fases mais importantes da patologia de insetos foi a descoberta da bactéria *Bacillus thuringiensis* no início do século XX. Depois desse período, o controle microbiano de insetos teve grandes avanços, chegando até a Era da Engenharia Genética e dando origem às plantas transgênicas que envolvem linhagens de *Bacillus thuringiensis*. No Brasil, os primeiros bioinseticidas surgiram na década de 1950 e poucos anos mais tarde já existiam produtos comerciais com diferentes microrganismos e importantes programas de controle de pragas implantados no país, inclusive ligados ao governo federal e órgãos estaduais.

Por outro lado, até o início do século XX pouco se conhecia sobre a ação de microrganismos no controle de fitopatógenos. Sabia-se que determinadas técnicas de manejo do solo favoreciam alguns microrganismos, reduzindo a incidência de doenças em raízes, contudo, não se conheciam os mecanismos envolvidos no controle. No começo da década de 1920 foram realizados os primeiros estudos sobre a ação de antagonistas em fungos causadores de tombamento. Os primeiros produtos para o controle de doenças surgiram 40 anos mais tarde, mas somente na década de 1970 foi que se criou a base conceitual e científica sobre o método de controle microbiano de doenças de plantas. No Brasil, a produção e comercialização de antagonistas, com destaque para o fungo *Trichoderma*, iniciaram em meados dos anos de 1990. Apesar de mais recente, há grande interesse dos pesquisadores pela área de controle biológico de doenças de plantas, o que certamente formará nos próximos anos uma base de informações mais sólida sobre o assunto.

Atualmente, o uso de agentes de biocontrole encontra-se bem difundido em diversos países. Entretanto, é uma estratégia ainda em crescimento na América Latina (Alves *et al.*, 2008b). Uma das razões para tal fato, além de aspectos sócio culturais, está relacionada à pequena quantidade de produtos disponíveis no mercado nacional. A produção massal de agentes de controle de pragas e doenças, viabilizando o fornecimento de grandes quantidades do microrganismo, é importante para a evolução desse método de controle no país. Muitos programas de controle biológico com microrganismos utilizam a estratégia de inundação, na qual o agente de controle deve estar disponível em grandes quantidades. Mesmo para estratégias inoculativas, que ocorrem com determinada periodicidade, a disponibilidade de um produto microbiano para o agricultor nas épocas mais favoráveis à aplicação é imprescindível.

O objetivo desse capítulo é relatar a evolução do método de controle microbiano, no que se refere à produção industrial e comercialização de microrganismos no Brasil, o potencial dos insumos microbianos e os progressos e dificuldades nessa fase do processo de controle biológico de pragas e doenças.

## Produção Industrial de Microrganismos

A multiplicação de microrganismos pode ser feita *in vivo*, sobre o hospedeiro alvo ou alternativo, ou *in vitro*, utilizando-se de meios artificiais em condições especiais de cultivo. Isso depende das características do agente microbiano de controle. Alguns fungos e bactérias são de difícil produção em meios artificiais, mas principalmente os vírus, que são patógenos obrigatórios, necessitam do hospedeiro para sua multiplicação. Diversos fungos, bactérias e nematóides podem se desenvolver em sistemas específicos de cultivo, utilizando-se normalmente meios artificiais.

**Produção *in vivo*.** A produção massal *in vivo* ocorre quando se pretende utilizar patógenos obrigatórios visando ao controle de alguma praga ou doença. São poucos os casos em que se aplica esse método industrialmente no Brasil e normalmente estão relacionados aos vírus e alguns nematóides de insetos.

No caso das viroses, dois exemplos merecem destaque: a produção do nucleopoliedrovírus da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) e o método de premunização de plantas com estirpes fracas de vírus.

O controle da lagarta-da-soja no Brasil com o vírus de poliedrose nuclear AgMNPV, que se iniciou na década de 1980 pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), é um dos maiores programas de controle biológico no mundo. No início, o vírus foi produzido em laboratório sobre criações do inseto em dieta artificial, como forma de disponibilizar o inóculo para posterior produção massal e aplicações em áreas maiores. Apesar de alguns esforços no começo da década de 1990 na direção da produção industrial utilizando procedimentos de criação do inseto em dieta artificial (Moscardi *et al.*, 1997; Moscardi, 1999), até 2003 a produção massal *in vivo* foi realizada principalmente a campo. A produção a campo é feita aplicando-se o vírus em concentrações acima da recomendada para o controle da praga. As aplicações são realizadas durante os meses de dezembro e janeiro, e em um único local de coleta podem ser obtidos por dia grandes quantidades de lagartas mortas por AgMNPV após a ação do microrganismo. Devem ser coletadas somente as lagartas com os sintomas e sinais característicos da infecção pelo baculovírus, evitando-se lagartas de outras espécies, lagartas infectadas com o fungo *Nomuraea rileyi* ou outros microrganismos. Ao final da coleta, todo o material deve ser acondicionado em temperaturas baixas para evitar sua deterioração (Moscardi, 1989; Moscardi, 1999; Moscardi & Sosa-Gómez, 2000; Moscardi *et al.*, 2002).

A redução nos custos de produção do vírus sobre lagartas criadas em dietas artificiais permitiu nos últimos anos o estabelecimento de biofábricas no país, obtendo-se um produto final com custo competitivo aos dos inseticidas sintéticos. A produção a campo ou em lagartas criadas em dietas artificiais, são responsáveis pelo fornecimento de toneladas de AgMNPV por ano, e chegaram a ser tratados cerca de 2.000.000 ha de soja (Moscardi & Santos, 2005; Sosa-Gómez *et al.*, 2008).

Em relação ao controle biológico de doenças de plantas é praticada no Brasil a técnica da premunização, que consiste na inoculação de estirpes fracas do vírus em plantas suscetíveis à forma severa do patógeno. Esses agentes de controle biológico são encontrados naturalmente em plantas que se sobressaem no cultivo comercial.

Há mais de 45 anos essa técnica é empregada no controle da tristeza dos citros, doença causada por um closterovírus limitado ao floema. A forma severa do vírus é capaz de infectar muitas espécies e variedades de citros. Pode causar a morte das combinações de citros em porta-enxerto de laranja azeda e induzem sintomas conhecidos pelo nome de caneluras e a produção de frutos pequenos em outras combinações de citros mais utilizadas no país. Além do uso de porta-enxertos tolerantes ao vírus, a técnica da premunização foi essencial para controle das manifestações severas da doença. Atualmente, praticamente todas as plantas de laranja Pera cultivadas no Brasil são originadas de material premunizado com estirpes fracas do vírus. A multiplicação do agente é realizada pela perpetuação de plantas matrizes e lotes premunizados (Müller & Costa, 1991). A premunização é feita antes da comercialização das mudas de citros, não existindo custos adicionais para o citricultor.

Processo semelhante é feito no caso dos vírus do mosaico PRSV-W e ZYMV que atacam as abobrinhas, algumas abóboras e outras cucurbitáceas. As perdas na produção por estirpes fortes desses vírus podem chegar a 100%, especialmente nos casos em que as plantas são infectadas no início de seu desenvolvimento e o controle químico do vetor é ineficaz. Algumas estirpes fracas são estáveis e protegem eficientemente as plantas quando premunizadas no estágio de folha cotiledonar. A produção das plantas premunizadas é bem maior do que plantas infectadas com o complexo normal do vírus e com qualidade das frutas semelhante à das plantas sadias (Rezende & Müller, 1995; Rezende & Pacheco, 1998; Rezende *et al.*, 1999; Dias & Rezende, 2000; Rabelo, 2002). Uma vez plantadas mudas premunizadas, a cultura está protegida contra o mosaico durante todo o seu ciclo de desenvolvimento. Atualmente, por meio de uma parceria entre empresa e universidade, as estirpes fracas do vírus estão sendo estudadas para serem disponibilizadas para que protejam a cultura das duas viroses simultaneamente.

Técnicas para a produção *in vivo* de nematóides entomopatogênicos das famílias Steinernematidae e Heterorhabditidae foram desenvolvidas para alguns casos no país, contudo em programas pequenos e de uso localizado. O cultivo *in vivo* possui algumas vantagens, como a simplicidade e o baixo custo da matéria prima e dos equipamentos empregados. Na prática, o maior gasto nesse sistema está na manutenção de grandes populações do hospedeiro, especialmente para os casos onde se utilizam dietas para a criação em laboratório. Nesse tipo de produção, em geral são usadas larvas de outros hospedeiros de fácil manutenção, como a traça *Galleria mellonella*, um dos insetos mais empregados no mundo para criação de nematóides *in vivo*.

O gorgulho (*Conotrachelus psidii*), uma importante praga em goiabeira, é estudado com mais atenção no Estado do Rio de Janeiro. Essa praga possui uma etapa de seu ciclo de vida no solo, favorecendo o controle por nematóides entomopatogênicos. Em testes preliminares, alguns heterorabditídeos mostraram-se promissores para o controle da praga (Dolinski *et al.*, 2006). A partir desses estudos, pequenos produtores de goiaba no Rio de Janeiro passaram a utilizar uma combinação de diferentes métodos de controle contra o gorgulho-da-goiaba. Os nematóides produzidos pelos próprios agricultores são aplicados na forma de cadáveres infectados. Os produtores também fazem controle cultural retirando os

frutos com marcas de ataque do inseto que contêm larvas no seu interior, reduzindo assim a população de gorgulho do ano seguinte. O óleo de nim é aplicado como inseticida alternativo contra adultos e a torta de nim contra as larvas no solo. Eliminando os inseticidas tradicionais, estas estratégias têm efetivamente reduzido os custos de produção (Dolinski, 2006).

Esforços foram feitos em um programa experimental de produção *in vivo* e uso de nematóides mermitídeos no controle de larvas de pernilongos, em 1998 no Estado de Roraima, onde a malária é comum. O convênio, entre a Secretaria de Saúde Estadual, a Universidade Federal do Estado de Roraima e o Instituto de Medicina Tropical de Havana em Cuba, teve como objetivos o estabelecimento de sistema local de produção em larga escala do nematóide *Ramanomerms iyengari* sobre larvas do mosquito *Culex quinquefasciatus* e a realização de estudos visando ao controle das espécies de *Anopheles* predominantes na região. Aplicações em criadouros naturais durante o período de julho a agosto de 1998 proporcionaram bons níveis de parasitismo e reduções significativas na densidade populacional de larvas (Mijares & Bellini, 2000).

Além dos vírus e nematóides, exemplos de produção *in vivo* são conhecidos e relatados na literatura com outros microrganismos. Na Colômbia, agricultores multiplicam *Bacillus popilliae* na propriedade sobre o hospedeiro, em virtude das características do microrganismo e da sensibilidade das larvas de alguns besouros. Somados aos levantamentos de outros inimigos naturais, foi feita a difusão entre agricultores de metodologias artesanais da produção *in vivo* da bactéria (Guarín, 2001). Fungos da ordem Entomophthorales, de difícil produção em meios artificiais, podem ser produzidos sobre o hospedeiro e feita a liberação das múmias no campo, como, por exemplo, para o controle de ácaros fitófagos.

**Produção *in vitro* - sistemas de fermentação.** Dentre os microrganismos com grande potencial para o desenvolvimento de bioprodutos, utilizando-se sistemas de produção em meios de cultura, estão as bactérias e os fungos. Para o controle de insetos destacam-se as bactérias *Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus* e os fungos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium* spp. e *Isaria* spp. No caso das doenças de plantas, a bactéria *Bacillus subtilis* e espécies do fungo *Trichoderma* estão entre os mais utilizados mundialmente.

A produção *in vitro* pode ser feita por meio de fermentações líquidas, sólidas ou semi-sólidas e em sistemas bifásicos, que utilizam as fermentações líquida e sólida em diferentes etapas. Apesar de a fermentação sólida ser utilizada, a fermentação líquida em reatores é o processo mais empregado para a produção massal de bactérias. Nesse caso são utilizadas diversas composições de meio de culturas, desde meios simples a base de caldo de coco e mandioca em sistemas artesanais feitos em alguns países latino-americanos, até resíduos das agroindústrias. Normalmente, os meios líquidos mais complexos são constituídos de farinhas, extratos de proteínas, açúcares e sais, misturados em água, em proporções que assegurem um balanço adequado de carbono e nitrogênio (Moraes *et al.*, 1998; Couch, 2000; Moraes *et al.*, 2001). Muitos dos aspectos referentes à produção de bactérias são segredos industriais que geram patentes das indústrias que os utilizam, sendo poucas as informações disponíveis na literatura especializada.

Para a produção de fungos é mais comum a fermentação sólida ou semi-sólida e o processo bifásico, que envolve as etapas de fermentação líquida e sólida. O desenvolvimento dos processos de produção de fungos no país iniciou-se no final da década de 1960, com a introdução de uma técnica de Trinidad & Tobago, que consiste no uso de cereais ou grãos pré-cozidos como substrato, principalmente arroz. Durante as décadas seguintes, adaptações no sistema tornaram o processo mais prático e a produção mais eficiente (Aquino *et al.*, 1977; Allard, 1987; Alves & Pereira, 1989; Leite *et al.* 2003). Toda a evolução do sistema ocorreu em função do estabelecimento do programa baseado no uso de *Metarhizium anisopliae* para o controle de cigarrinhas em cana-de-açúcar e pastagens. Atualmente, utiliza-se a mesma técnica com pequenas modificações para a produção de outros fungos que controlam insetos e ácaros, como *Beauveria bassiana* e *Lecanicillium*.

Grande parte das técnicas desenvolvidas para a produção de fungos entomopatogênicos no país foi transferida para a produção massal de *Trichoderma*. As espécies mais pesquisadas em relação à produção são: *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma asperellum*, usadas no controle de fungos habitantes de solo causadores de podridões radiculares e murchas; e *Trichoderma stromaticum*, para o controle da vassoura-de-bruxa em cacau. São também usados como substrato grãos de milho, trigo, sorgo, arroz ou milheto, normalmente visando a produção de conídios como ingrediente ativo do produto. Outros fungos antagonistas também se adaptam à fermentação sólida em grãos, como *Acremonium persicinum* para o controle da lixada-coqueiro e *Dicyma pulvinata* (*syn. Hansfordia pulvinata*) para o controle do mal-das-folhas em seringueira.

O sistema bifásico de produção vem sendo mais aplicado nos últimos anos no país para alguns fungos entomopatogênicos, contudo, a etapa de fermentação sólida ainda é feita em cereais ou grãos pré-cozidos. Em alguns casos, apenas a fermentação líquida é utilizada para a produção massal, como ocorre com o fungo *Sporothrix insectorum*, agente controlador do percevejo-de-renda da seringueira (Leite *et al.*, 2003).

Cabe ressaltar, que o processo de produção sólida empregado atualmente no país é simples e pouco automatizado, mas eficiente e de custo compatível com a agricultura nacional. Certamente, técnicas inovadoras, de baixo custo, que possam ser implantadas no sistema atual devem ser pesquisadas para permitir uma evolução maior do setor. O crescimento de uma indústria de bioprodutos deve ser, contudo, cuidadosamente avaliado e projetado, considerando que o aumento de escala está ligado diretamente com problemas relacionados à qualidade final do produto.

## **Desenvolvimento de Formulações Microbianas**

Assim como para a produção de microrganismos, são poucos os detalhes disponíveis na literatura referentes ao desenvolvimento de formulação de bioprodutos. São informações obtidas, normalmente, com pesquisas específicas das próprias indústrias e intimamente ligadas às peculiaridades do sistema de produção massal adotado por cada uma delas. É inquestionável que o

desenvolvimento de uma nova e eficaz formulação microbiana não significa uma simples mistura de inertes a determinado ingrediente ativo. Trata-se de um processo mais complexo e devem ser observados aspectos como o tipo e características do propágulo utilizado como ingrediente ativo, as características do sistema produtivo (condições de fermentação, sistema de secagem e segregação do ingrediente ativo entre outros), as características físicas e químicas dos inertes, a compatibilidade dos componentes da formulação ao microrganismo, a estabilidade do ingrediente ativo no armazenamento, o efeito no desempenho ou atividade do formulado sobre o alvo em relação ao microrganismo não formulado, entre outros. Esses conhecimentos são indispensáveis para o sucesso da formulação no campo.

Boa parte das formulações microbianas registradas e comercializadas no Brasil tem como ingrediente ativo as bactérias, normalmente importadas da Europa, Estados Unidos e Japão. Grandes empresas se interessaram pelas bactérias como produto, em especial as entomopatogênicas. A maior facilidade de produção massal, aspectos referentes ao modo de ação e a estabilidade de formulações bacterianas são alguns pontos que despertaram tal interesse a partir da década de 1950. Atualmente, a maioria dos produtos para controle biológico disponíveis é a base de bactérias (Schnepf *et al.*, 1998; Glare & O'Callaghan, 2000).

No caso de produtos baseados nos fungos, no país, para a maioria deles o ingrediente ativo é a fase conidial, oriundo da reprodução assexuada do microrganismo. Esses podem estar associados a ingredientes inertes ou utilizados isoladamente. Estão disponíveis no mercado nacional formulações granuladas (G), pós-molháveis (WP) e suspensões concentradas em óleo emulsionável (SC) (Almeida *et al.*, 2008). Dependendo da formulação, as aplicações podem ser feitas em pulverização, polvilhamento, no tratamento de sementes, via irrigação ou em mistura com substratos orgânicos na produção de mudas.

Igualmente ao que ocorre com a produção, as formulações microbianas são bastante simples, à exceção dos produtos importados à base de bactérias. Para o baculovirus da lagarta-da-soja, na fase inicial do programa o vírus era aplicado após maceração e filtragem das lagartas mortas coletadas. Somente a partir de 1986, formulações do vírus foram desenvolvidas, sendo atualmente as mais utilizadas pelos sojicultores (Moscardi, 1989; Moscardi, 1998; Moscardi & Sosa-Gómez, 2000). Para fungos, em muitos casos, o inerte da formulação é o próprio substrato de cultivo. Isso implica em menor estabilidade do produto final no armazenamento, que deve ser feito em condições de baixa temperatura e utilizado no campo rapidamente. Nos últimos anos, houve uma evolução de alguns bioprodutos com o surgimento de formulações oleosas, principalmente para *Metarhizium anisopliae* e *Trichoderma harzianum*. Essa formulação propicia maior estabilidade do ingrediente ativo quando armazenado em temperatura ambiente (24-26 °C), facilitando a sua comercialização sem perda de qualidade. Além disso, apresenta vantagens quanto à facilidade de aplicação, proteção no campo da ação da radiação UV, ação do patógeno sobre a praga e proteção do ingrediente ativo em mistura com outros produtos químicos (Alves *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2008d; Lopes *et al.*, 2008). Contudo, o desenvolvimento de formulações microbianas é ainda um campo pouco explorado no país.

## Comercialização de Produtos Microbianos

A comercialização de produtos microbianos pode ser vista sob ângulos diferentes, considerando, principalmente, as características dos produtos e das empresas presentes no mercado nacional. Os produtos importados à base de bactérias, que na sua maioria possuem como ingrediente ativo subespécies de *Bacillus thuringiensis* utilizadas para o controle de lepidópteros, seguem o mesmo modelo comercial dos agrotóxicos. Isso porque são formulações com características semelhantes as dos produtos químicos, ou seja, boa estabilidade no armazenamento e ação rápida sobre o alvo. Outra peculiaridade é que a sua comercialização é feita por empresas bem estruturadas e organizadas no mercado agrícola brasileiro, com disponibilidade de recursos financeiros e humanos. Todos esses aspectos tornam a comercialização desse grupo de bioinseticidas bem conhecida. Entretanto, até o presente, aparentemente não existe um enfoque dessas empresas ao mercado de consumidores de produtos biológicos. Muitos técnicos e agricultores utilizam esse produto microbiano sem mesmo saber de sua origem biológica.

No outro extremo estão os produtos microbianos comercializados por empresas nacionais de pequeno e médio porte, que são os vírus e, principalmente, os fungos entomopatogênicos e antagonistas. Com recursos mais limitados, as empresas buscam resolver as dificuldades de um produto que exige condições de armazenamento e transporte diferenciadas e que a estratégia de uso e o modo de ação sobre o alvo são pouco conhecidos pelo agricultor. Entremeam esse mercado alguns investidores oportunistas com pessoal não especializado na área, que surgem com a mesma rapidez que desaparecem, produzindo e comercializando produtos de péssima qualidade e em busca de um retorno financeiro rápido, mesmo que efêmero.

Mesmo depois de algumas décadas do início do programa de controle da cigarrinha *Mahanarva posticata* no Nordeste pelo extinto Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar (Planalsucar) (Marques *et al.*, 1981; Marques *et al.*, 2005), a maior demanda para fungos no Brasil ainda está relacionada à cultura da cana-de-açúcar, em um dos maiores programas mundiais de uso de um fungo para o controle de um inseto. Com os problemas ocasionados pela praga no Nordeste e com a expansão atual da área plantada em outros estados, agravando o problema com a cigarrinha *Mahanarva fimbriolata*, o uso de *Metarhizium anisopliae* deve também crescer.

Para o programa de controle das cigarrinhas, a maior parte dos produtos é fornecida por empresas privadas, contudo, muitas usinas de açúcar e destilarias de álcool possuem laboratórios e sua própria produção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Alves *et al.*, 2008c). Diferentemente das empresas privadas, a produção do fungo não é o objetivo final das usinas e poucas são auto-suficientes, recorrendo aos produtos no mercado. De modo semelhante, as usinas não investem em sistemas de produção e na formulação do microrganismo, priorizando a máxima redução nos custos na obtenção do produto. A aplicação de *Metarhizium anisopliae* para o controle da cigarrinha *Mahanarva* foi feita, em 2005, em cerca de 200 mil hectares de cana-de-açúcar somente no estado de São Paulo (Almeida & Batista Filho, 2006) e,

provavelmente, em mais de 450 mil ha em todo o país. Em 2007, estima-se que no Brasil esse número tenha atingido 1 milhão de ha (Alves *et al.*, 2008a). Cerca de 75% do volume produzido e utilizado é fornecido pelas indústrias privadas, o restante é obtido nas biofábricas dentro das usinas ou em órgãos públicos estaduais e municipais. A maior parte dos produtos não é formulada, o fungo é comercializado no próprio substrato de cultivo, logo após o seu ciclo reprodutivo e sem processamento.

Além de *Metarhizium anisopliae*, outros fungos que atacam artrópodes estão disponíveis no mercado nacional. Entre esses se destacam os produtos à base de *Beauveria bassiana* para o controle de alguns insetos e ácaros, de *Lecanicillium longisporium* para o controle da cochonilha ortézia e de *Sporothrix insectorum* para o controle do percevejo-de-renda da seringueira. Poucas empresas produzem essas espécies, os produtos no mercado são menos numerosos e seu uso mais restrito, sendo que todos juntos representam uma fatia muito pequena do mercado dos bioinseticidas fúngicos.

Outro grupo de fungos comercializado em grande quantidade no país é o de antagonistas de fitopatógenos habitantes do solo ou que possuam uma fase de seu ciclo no solo. Dentre os antagonistas, *Trichoderma* é certamente o mais utilizado no Brasil, com dezenas de produtos disponíveis no mercado. As doenças visadas são as podridões radiculares e as murchas vasculares causadas por *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Sclerotium*, *Fusarium*, *Verticillium* e *Phytophthora* entre outras.

Os produtos à base de *Trichoderma* podem ser empregados de várias maneiras no campo pelo agricultor, o que depende da cultura e das doenças alvo. Na produção de mudas de hortaliças e ornamentais o antagonista é misturado ao substrato antes do plantio (Melo, 1998; Morandi *et al.*, 2006; Tatagiba *et al.*, 2005; Bettiol *et al.*, 2008). Em canteiros ou covas o produto pode ser incorporado ao solo ou aplicado em pulverização ou rega durante o preparo da área de transplantio (Valdebenito-Sanhueza, 1991). Também pode ser veiculado às sementes ou aplicado via pulverização do sulco de plantio em grandes áreas de cultivo de feijão, soja e milho (Lobo Jr. *et al.*, 2005). Pode ser ainda aplicado via fertirrigação em diversos cultivos ou via irrigação por pivô em área total (Lobo Jr. *et al.*, 2006). Por se tratar de um microrganismo adaptado à rizosfera, seu uso no controle de doenças de parte aérea, especialmente as manchas foliares e ferrugens, é ineficaz, ou faltam estudos que comprovem sua ação. Cabe ressaltar que além da ação de supressão de fitopatógenos de solo, *Trichoderma* tem um importante e significativo efeito no crescimento das plantas e no aumento de produtividade em diversas culturas.

Seja no caso dos bioinseticidas como dos biofungicidas, a maior parte da comercialização desses produtos no país é voltada à agricultura convencional. Esses produtos podem ser associados às diferentes táticas de controle de pragas e doenças, inclusive com os agrotóxicos, em um sistema de manejo. Obviamente, informações sobre a compatibilidade dos produtos químicos com os microrganismos devem ser consideradas e solicitadas pelo agricultor às empresas que produzem o insumo biológico. Embora alguns produtos sejam usados atualmente em grandes culturas anuais, com resultados satisfatórios, os cultivos perenes e semi-perenes e os cultivos intensivos em casas-de-vegetação oferecem melhores condições para o estabelecimento e uso dos microrganismos.



O mercado de hortaliças e flores é também importante, considerando que o problema de resíduos em alimentos de consumo direto ou *in natura* é mais crítico, especialmente para produtos de exportação. A agricultura orgânica é outro campo em crescimento e, certamente, mais dependente de insumos biológicos do que o modelo convencional.

## **Registro de Bioprodutos no Brasil**

Uma das dificuldades para a evolução do mercado de bioprodutos no Brasil é o alto custo para registro. Como boa parte das empresas nacionais é de pequeno porte e com recursos financeiros limitados, os custos do registro restringem o desenvolvimento das indústrias que produzem agentes microbianos de controle. A necessidade inquestionável de as empresas terem seus produtos de acordo com a legislação nacional acaba desviando parte dos recursos que poderiam ser empregados em pesquisas ou em outros setores da indústria, como melhorias no sistema de produção e formulação. As vantagens dos produtos biológicos, sua segurança em relação aos agrotóxicos, já bem discutidas e relatadas na literatura, e a experiência de seu uso em larga escala em diversos países por muitos anos são importantes para a revisão de alguns aspectos da lei. A possível flexibilização ou a interpretação diferenciada das normas de registro podem reduzir a necessidade de altos investimentos por parte da empresa e diminuir a dependência de investimentos externos.

Alguns países latino-americanos, incluindo o Brasil, buscaram por meio do Comitê de Sanidad Vegetal del Cone Sur (Cosave) formas de padronização do registro de bioprodutos. Um comitê de controle biológico, o Grupo de Trabalho Permanente com Controle Biológico (GTB-CB), foi criado para que normas de registro fossem adotadas por esses países (Nardo *et al.*, 1998). Apesar desses esforços, a discussão dos pontos positivos e negativos, da maior ou menor flexibilização no processo de registro de produtos microbianos levou, nos últimos anos, à busca de regras próprias. No Brasil, a norma de registro de produtos microbianos (Instrução Normativa Conjunta nº3, regulada pela Lei 7.802 de 1989 e Decreto 4.074 de 2002) foi aprovada em março de 2006. A criação dessas novas normas teve suporte no documento proposto pela Embrapa Meio Ambiente, que resgatou os esforços anteriores de diferentes instituições nacionais, na forma de uma portaria publicada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama - Portaria 131 de 3 de novembro de 1997) (Capalbo *et al.*, 1999).

No entanto, a flexibilização sem critério ou a simples liberação do compromisso de registro, por se considerar que os biopesticidas são produtos naturais, pode trazer consequências negativas ao setor. Acaba-se criando condições para a inundação do mercado por produtos de baixa qualidade e com baixa eficiência em campo. O agricultor desencorajado pela ineficiência do produto, não mais utiliza os produtos biológicos, prejudicando, de uma forma geral, todo o segmento. É necessário que, em discussão com o meio científico e com as empresas privadas, as agências reguladoras encontrem um equilíbrio no sistema de registro

de modo a não retardar o desenvolvimento dos produtos e das empresas, mas que evite a comercialização de produtos de baixa qualidade. Isso reduziria os custos de registro e removeria algumas distorções geradas pelo fato do produto biológico de uso agrícola estar incluído na mesma legislação dos agrotóxicos. Com esse intuito, empresas do setor estão se mobilizando e foi criada, durante a IX Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, em Campinas, SP, a Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (ABC BIO), com o objetivo principal de viabilizar as discussões com os órgãos reguladores e com o meio científico.

Certamente, aliada a toda e qualquer interpretação diferenciada das normas, um sistema rígido da fiscalização dos produtos em comercialização é de extrema importância, sistema esse ineficaz ou praticamente inexistente no mercado nacional. Assim, novos produtos são lançados no mercado todo o ano, sem o interesse das empresas em investirem no registro. Esse fato ocorre até hoje no Brasil, onde existem dezenas de formulações disponíveis no mercado, mas poucas registradas e em conformidade com a legislação vigente. De qualquer forma, a tendência é que as forças do próprio mercado regulem o desenvolvimento das empresas privadas. Porém, é indiscutível e vital para a evolução do controle biológico que existam normas claras e a necessidade do registro dos produtos, e que todas as empresas do setor sigam essas normas.

Boa parte dos produtos microbianos registrados no Brasil é à base de bactérias, com destaque para *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* e *aizawai* utilizados no controle de lagartas. Outras bactérias, como *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* e a espécie *Bacillus sphaericus*, usadas para o controle de pernilongos em áreas urbanas, possuem registro como produto biológico domissanitário e seguem legislação diferenciada. Alguns produtos baseados no vírus da poliedrose nuclear usado no controle da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* também têm registro. No caso de fungos, apenas *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* utilizados para o controle de insetos e ácaros, e *Trichoderma harzianum* para o controle de doenças de plantas estão registrados. Outras espécies de microrganismos e novas formulações ainda estão em fase intermediária ou em fase final do processo. A nova regulamentação é aplicada para produtos formulados com microrganismos de ocorrência natural para o controle de pragas e doenças de plantas. Os produtos que contêm microrganismos modificados geneticamente são ainda analisados por um comitê de biossegurança.

## Considerações Finais

A busca pelo equilíbrio biológico ou a recomposição da população de inimigos naturais em áreas degradadas pelo manejo incorreto das culturas é indispensável para a melhor sustentação do sistema agrícola. Nessa interpretação, os agentes de controle microbiano de pragas e doenças têm um papel importante e o agricultor deve sempre buscar conservar esses organismos no agroecossistema. Os produtos biológicos ou bioreguladores em comercialização podem certamente auxiliar nessa recomposição, pois a agricultura por si só trata-se de um sistema artificial, com a ação reducionista e constante do homem, no que diz respeito à biodiversidade.

Sem dúvida, para o agricultor devem ser claras as vantagens do uso dos produtos biológicos em sua propriedade. Para isso, o benefício que se espera do tratamento biológico deve ser compatível com o custo ou investimento no método. Entende-se por benefício não somente a ação direta do produto sobre o alvo, mas o fato dos produtos biológicos serem biodegradáveis, seguros ao homem, seletivos a outros organismos e não causarem desequilíbrios quando comparados com os agrotóxicos. Normalmente, apesar da eficiência momentânea, não se credita aos agrotóxicos seu “custo ecológico”, ou seja, sua ação indesejada sobre o equilíbrio de um sistema agrícola, sobre o ambiente ou sobre o homem. Sem dúvida, para se obter a relação positiva de custo-benefício, o produto microbiano deve ser compatível economicamente com a condição do agricultor, desde as grandes empresas rurais até o pequeno produtor rural. Contudo, o preço reduzido do produto comercial nem sempre significa boa relação custo-benefício, pois muitos produtos são de procedência duvidosa, de péssima qualidade e comercializados sem critérios técnicos. O agricultor deve sempre buscar informações sobre as empresas que atuam no mercado e seus produtos, preferindo os produtos registrados e de empresas sérias, estabelecidas no mercado e que apresentem convênio ou parceria com instituições de pesquisa reconhecidas.

Deve-se ressaltar, entretanto, que o sucesso do controle biológico de pragas e doenças não depende apenas da disponibilidade de produtos microbianos no mercado. O agricultor não deve entender essa modalidade de controle como uma simples substituição do produto químico convencional pelo biológico. Trata-se de uma mudança mais profunda e que deve ser encarada com uma visão mais ampla, dentro de um contexto de manejo integrado. Desse modo, é importante que o insumo biológico não seja comercializado e utilizado como um simples produto, e sim como um pacote tecnológico ou processo de controle.

## Referências

- Allard, G.B. Prospects for the biocontrol of the sugarcane froghopper with particular reference to Trinidad. *Biocontrol News and Information* 8: 105-115. 1987.
- Almeida, J.E.M. & Batista Filho, A. Controle biológico da cigarrinha da raiz da cana-de-açúcar com o fungo *Metarhizium anisopliae*. São Paulo SP. Instituto Biológico/APTA. 2006. 19 p. (Boletim Técnico 15).
- Almeida, J.E.M.; Batista Filho, A.; Alves, S.B.; Leite, L.G. & Neves, P.M.J.O. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008. pp. 257-273.
- Alves, S.B. (Ed.) Controle Microbiano de Insetos. 1ª Ed. São Paulo. Manole. 1986.
- Alves, S.B. (Ed.) Controle Microbiano de Insetos. 2ª Ed. Piracicaba. Fealq. 1998.
- Alves, S.B. & Pereira, R. M. Produção de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em bandejas. *Ecossistema* 14: 188-192. 1989.
- Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Pauli, G.; Mascarin, G.M. & Vieira, S.A. Efeito de diferentes formulações de *Metarhizium anisopliae* na proteção à radiação e eficiência no controle de *Mahanarva fimbriolata*. Anais, X. Simpósio de Controle Biológico, Brasília DF. 2007. CD-ROM, ID-255.
- Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Vieira, S.A. & Tamai, M.A. Fungos entomopatogênicos usados no controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008a. pp. 69-110.
- Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Pereira, R.M. & Tamai, M.A. O controle microbiano na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008b. pp. 21-48.

- Alves, S.B.; Leite, L.G.; Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M. & Marques, E.J. Produção massal de fungos entomopatogênicos na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008c. pp. 215-234.
- Alves, S.B.; Lopes, R.B.; Pauli, G.; Mascarin, G.M. & Delalibera Jr., I. Eficiência de formulações de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* no controle de lagartas de *Diatraea saccharalis* em laboratório e campo. Anais, XXII. Congresso Brasileiro de Entomologia, Uberlândia-MG. 2008d. CD-ROM.
- Aquino, M.L.N.; Vital, A.F.; Cavalcanti, V.L.B. & Nascimento, M.G. Cultura de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin em sacos de polipropileno. Recife. Comissão Executiva de Defesa Fitossanitária da Lavoura Canavieira de Pernambuco. 1977. 11 p. (Boletim Técnico da CODECAP, n°5).
- Bettiol, W.; Ghini, R.; Morandi, M. A. B.; Stadnik, M.J.; Krauss, U.; Stefanova, M. & Prado, A.M.C. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) Controle microbiano de pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008. pp. 303-327.
- Capalbo, D. M. F.; De Nardo, E.A.B.; Moraes, G. J.; Oliveira, M.C.B. & Castro, V.L.S.S. Avaliação de Agentes Microbianos de Controle de Pragas para Registro como Bioinseticidas: uma proposta para órgãos federais registrantes - Informações sobre o produto e análises de resíduo. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 1999.
- Couch, T.L. Industrial fermentation and formulation of entomopathogenic bacteria, In: Charles, J.F.; Delecluse, A. & Nielsen-Leroux, C. (Eds.) Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application. Amsterdam. Kluwer Academic Publishers. 2000. pp. 297-316.
- De Nardo, E.A.B.; Moraes, G.J. & Sá, L.A.N. Regulamentação do uso de agentes microbianos de controle. In: Alves, S.B. (Ed.) Controle microbiano de insetos. Piracicaba. FEALQ. 1998. pp. 1119-1142.
- Dias, P.R.P. & Rezende, J.A.M. Premunização da abóbora híbrida Tetsukabuto para o controle do mosaico causado pelo *Papaya ringspot virus* - type W. Summa Phytopathologica 26: 390-398. 2000.
- Dolinski, C. Developing a research and extension program for control of the guava weevil in Brazil using entomopathogenic nematodes. Abstracts, XXXV. Annual Meeting of the Society of Nematologists, Hawaii, Lihue, 38. 2006. p. 270.
- Dolinski, C.M.; Del Valle, E.E. & Stuart, R. Virulence of entomopathogenic nematodes to larvae of the guava weevil *Conotrachelus psidii* (Coleoptera: Curculionidae) in laboratory and greenhouse experiments. Biological Control 38: 422-427. 2006.
- Glare, T.R. & O'Callaghan, M. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. Chichester. John Wiley & Sons. 2000.
- Guarín, J.H. Caracterización de la enfermedad lechosa y evaluación de la patogenicidad de su agente causal *Bacillus popilliae* sobre *Phyllophaga obsoleta* Blach. (Coleoptera: Melolonthidae). Revista Actualidades Corpoica 15: 15-23. 2001.
- Leite, L.G.; Batista Filho, A.; Almeida, J.E.M. & Alves, S.B. Produção de Fungos Entomopatogênicos. Ribeirão Preto. A.S. Pinto. 2003.
- Lobo Jr., M.; Pimenta, G. & Ballarotti, A. Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* em campo com *Trichoderma harzianum*. Fitopatologia Brasileira 30S: 91. 2005. (Resumo).
- Lobo Jr., M.; Pimenta, G. & Gontijo, G.H. Controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* por *Trichoderma harzianum* em condições de campo. Fitopatologia Brasileira 31S: 362. 2006. (Resumo).
- Lopes, R.B.; Alves, S.B.; Pauli, G.; Mascarin, G.M.; Oliveira, D.G.P. & Vieira, S.A. Efeito da formulação em óleo emulsionável de *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* na proteção a fungicidas químicos. Anais, XXII. Congresso Brasileiro de Entomologia, Uberlândia MG. 2008. CD-ROM.
- Marques, E.J.; Villas Boas, A.M. & Pereira, C.E.F. Orientações técnicas para a produção do fungo entomógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em laboratórios setoriais. Boletim Técnico Planalsucar 3: 5-23. 1981.
- Marques, E.J.; Lima, R.O.R.; Vilas Boas, A.M. & Pereira, C.E.F. Controle biológico da cigarrinha da folha *Mahanarva posticata* (Stal) (Hemiptera: Cercopidae) em cana-de-açúcar nos Estados de Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. In: Mendonça, A.F. (Ed.) Cigarrinhas da Cana-de-açúcar: controle biológico. Maceió. Insecta. 2005. pp. 295-301.

- Melo, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Controle Biológico. Jaguariúna. Embrapa. 1998. pp. 17-67.
- Mijares, A.S. & Bellini, A.C. Producción masiva de *Romanomermis iyengari* y su aplicación en criaderos de anofelinos en Boa Vista (Roraima), Brasil. Revista Panamericana de Salud Publica 7: 155-161. 2000.
- Moraes, I.O.; Capalbo, D.M.F. & Arruda, R.O. Produção de bactérias entomopatogênicas. In: Alves, S.B. (Ed.) Controle microbiano de insetos. Piracicaba. Fealq. 1998. pp. 815-843.
- Moraes, I.O.; Capalbo, D.M.F. & Moraes, R.O.M. Produção de bioinseticidas. In: Lima et al. (Eds.) Biotecnologia Industrial. Vol. 3. São Paulo. Edgar Blücher. 2001. pp. 249-278.
- Morandi, M.A.B.; Bettiol, W. & Ghini, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Venzon, M.; Paula Jr., T.J. & Pallini, A. (Eds.) Controle Alternativo de Pragas e Doenças. Viçosa. Epamig. 2006. pp. 247-267.
- Moscardi, F. Use of viruses for pest control in Brazil: the case of the nuclear polyhedrosis virus of the soybean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 84: 51-56. 1989
- Moscardi, F. Utilização de vírus entomopatogênicos em campo. In: Alves, S.B. (Ed.) Controle Microbiano de Insetos. Piracicaba. Fealq. 1998. pp. 509-539.
- Moscardi, F. Assessment of the application of Baculoviruses for control of Lepidoptera. Annual Review of Entomology 44: 257-289. 1999.
- Moscardi, F. & Santos, B. Produção comercial do nucleopoliedrovírus de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lep.: Noctuidae) em laboratório. Anais, IX. Simpósio de Controle Biológico. Recife PE. 2005. p. 42.
- Moscardi, F. & Sosa-Gómez, D.R. Microbial control of insect pests of soybeans. In: Lacey, L. & Kaya, H. (Eds.) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 2000. pp. 447-466.
- Moscardi, F.; Leite, L.G. & Zamataro, C.E. Production of nuclear polyhedrosis virus of *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): Effect of virus dosage, host density and age. Annals of the Entomological Society 26: 121-132. 1997.
- Moscardi, F.; Morales, L. & Santos, B. The successful use of AgMNPV for the control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, in soybean in Brazil. Proceedings, 35<sup>a</sup>. Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Foz de Iguaçu. 2002. pp. 86-91.
- Muller, G.W. & Costa, A.S. Premunização de plantas cítricas. In: Bettiol, W. (Ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. pp. 285-293.
- Rabelo, L.C. Seleção de estirpe fraca do *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) e controle dos mosaicos comum (*Papaya ringspot virus*) e amarelo (ZYMV) por dupla premunização em abobrinha-de-moita. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2002.
- Rezende, J.A.M. & Müller, G.W. Mecanismos de proteção entre vírus e controle de viroses de vegetais por premunização. Revisão Anual de Patologia de Plantas 3:185-226. 1995.
- Rezende, J.A.M. & Pacheco, D.A. Control of papaya ringspot virus-type W in zucchini squash by cross protection in Brazil. Plant Disease 82: 171-175. 1998.
- Rezende, J.A.M.; Pacheco, D.A. & Iemma, A.F. Efeitos da premunização da abóbora 'Menina Brasileira' com estirpes fracas do vírus do mosaico do mamoeiro-estirpe melancia. Pesquisa Agropecuária Brasileira 34: 1481-1489. 1999.
- Schnepf, E.; Crickmore, N.; Van Rie, J.; Lereclus, D.; Baum, J.; Feitelson, J.; Zeigler, D. R. & Dean, D. H. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775-806. 1998.
- Sosa-Gómez, D.R.; Moscardi, F.; Santos B.; Alves, L.F.A. & Alves, S.B. Produção e uso de vírus para o controle de pragas na América Latina. In: Alves, S.B. & Lopes, R.B. (Eds.) Controle Microbiano de Pragas na América Latina: avanços e desafios. Piracicaba. FEALQ. 2008. pp. 49-66.
- Tatagiba, J.S.; Oliveira, K.V. & Aguilar, M.A. Avaliação da eficiência do Trichodermil PM no controle da podridão de *Phytophthora* na cultura do mamão. Fitopatologia Brasileira. 30S: 79. 2005. (Resumo).
- Valdebenito-Sanhueza, R.M. Possibilidades do controle biológico de *Phytophthora* em macieira. In: Bettiol, W. (Ed.) Controle Biológico de Doenças de Plantas. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. pp. 303-305.

## Capítulo 3

# Impactos das Mudanças Climáticas sobre o Controle Biológico de Doenças de Plantas

Wagner Bettiol & Raquel Ghini

*Embrapa Meio Ambiente, CP 69; 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil; e-mail: bettiol@cnpma.embrapa.br; raquel@cnpma.embrapa.br. Bolsistas do CNPq.*

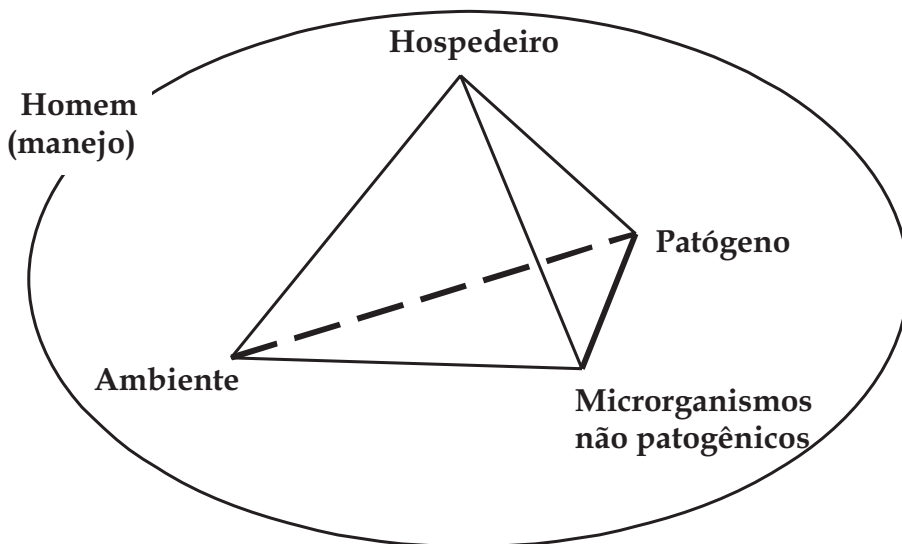
## Introdução

No final do século XVIII, iniciou-se a Revolução Industrial, marcada por um grande salto tecnológico especialmente nos setores de transportes e máquinas. Os métodos de produção se tornaram mais eficientes e a exploração dos recursos naturais pelo homem tomou proporções jamais conhecidas. Concomitantemente, os problemas de degradação ambiental pela ação antrópica assumiram grande importância. A concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) na atmosfera atingiu valores significativamente superiores aos ocorridos nos últimos 650 mil anos (Siegenthaler *et al.*, 2005). Situação semelhante foi observada para o metano ( $\text{CH}_4$ ) e o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) (Spahni *et al.*, 2005). Esses gases, assim como o vapor de água, o ozônio ( $\text{O}_3$ ) e outros, denominados gases de efeito estufa, retêm parcialmente a radiação térmica que é emitida quando a radiação solar atinge a superfície do planeta. O aumento na concentração dos gases de efeito estufa, devido à ação antrópica, dificulta a eficiência com que a Terra se resfria. Por esse motivo, estão sendo verificadas alterações no clima. A temperatura média da superfície do planeta aumentou  $0,2\text{ }^\circ\text{C}$  por década nos últimos 30 anos (Hansen *et al.*, 2006).

Desde 2000, a taxa de aumento da concentração de  $\text{CO}_2$  está crescendo mais rapidamente que nas décadas anteriores (Canadell *et al.*, 2007). Onze dos doze anos mais quentes já registrados por instrumentos desde 1850 ocorreram entre 1995 e 2006 – a exceção sendo 1996. Alterações no ciclo da água também foram observadas. As mudanças devem continuar ocorrendo, mesmo se a concentração de gases de efeito estufa se estabilizar, devido à inércia térmica do sistema e ao longo período necessário para retornar ao equilíbrio (IPCC, 2007).

O ambiente influencia todas as etapas das interações hospedeiro-patógeno-agentes de controle biológico. As variáveis climáticas (umidade, temperatura, vento e UV, entre outros) interferem na incidência de doenças, pois afetam o crescimento, a reprodução e a dispersão das plantas, dos patógenos e dos agentes de biocontrole. Além disso, o clima afeta os organismos com os quais a planta, o patógeno e os antagonistas interagem, como microrganismos endofíticos e saprófitas. Dessa forma, as mudanças climáticas afetarão os agentes de biocontrole e, por conseguinte, interferirão na ocorrência das doenças de plantas.

Doença, na abordagem de controle biológico, é mais do que uma íntima interação do patógeno com o hospedeiro influenciada pelo ambiente. É o resultado de uma interação entre hospedeiro, patógeno e uma variedade de não-patógenos que também repousam no sítio de infecção e que apresentam potencial para limitar ou aumentar a atividade do patógeno ou a resistência do hospedeiro (Cook & Baker, 1983; Cook, 1985). Dentro dessa abordagem, o fator ambiente precisa ser considerado agindo sobre o patógeno, o hospedeiro e os demais organismos do sítio de infecção (Figura 1).



**Figura 1.** Tetraedro de doença, destacando as interações entre o ambiente, o patógeno e os microrganismos não patogênicos presentes no sítio de infecção do hospedeiro. O homem pode alterar as relações entre os fatores, favorecendo ou não a ocorrência das doenças.

O controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado como sendo o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo. Os mecanismos de ação dos antagonistas normalmente envolvidos no controle biológico são: antibiose, competição, parasitismo, predação, hipovirulência e indução de defesa do hospedeiro (Bettiol, 1991). Entretanto, conceitos mais abrangentes são aceitos pelos fitopatologistas. Assim, para Cook & Baker (1983), controle biológico é “a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem”. Os

mesmos autores explicam que atividades determinantes de doenças envolvem crescimento, infectividade, virulência, agressividade e outras qualidades 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. Incluem, ainda, a planta hospedeira manipulada geneticamente ou por práticas culturais, ou microrganismos, para maior ou mais efetiva resistência contra o patógeno e antagonistas definidos como microrganismos que interferem na sobrevivência ou em atividades determinantes de doenças causadas por patógenos. Nessa visão, o controle biológico pode ser acompanhado por práticas culturais para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira ou ambos; melhoramento da planta para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades dos antagonistas; introdução em massa de antagonistas, linhagens não patogênicas ou outros organismos ou agentes benéficos.

As comunidades de organismos da rizosfera e da filosfera, que normalmente não são consideradas no controle de doenças, ganham destaque no controle biológico, pois são os principais atores nessa modalidade de controle, principalmente quando se considera o controle biológico natural. Segundo Coakley *et al.* (1999), mudanças climáticas podem alterar a composição e a dinâmica da comunidade microbiana do ambiente aéreo e do solo suficientemente para influenciar a saúde dos órgãos das plantas. Mudanças na comunidade microbiana da filosfera e da rizosfera podem influenciar a ocorrência de doenças de plantas por meio do controle biológico (natural ou aumentativo). Esses autores ainda afirmam que o efeito direto da elevação da concentração de CO<sub>2</sub> na microbiota do solo é improvável nesse ambiente onde estão normalmente expostas a níveis 10 a 15 vezes maiores do que a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico. Entretanto, há a necessidade de se considerar que as mudanças climáticas envolvem também aspectos fundamentais do solo para a atividade microbiana, como a disponibilidade de nutrientes, o aumento da temperatura e, dependendo da região, a redução na umidade do solo. Além disso, a quantidade de nitrogênio que é introduzida nos sistemas naturais e no agroecossistema por meio de fertilizantes e poluentes pode causar significativos impactos na microbiota (Nosengo, 2003). Grüter *et al.* (2006) concluíram que a exposição do ambiente à concentração de 600 ppm de CO<sub>2</sub> (aproximadamente o dobro da atual) não alterou quantitativamente a comunidade de bactérias do solo. Entretanto, os mesmos autores concluíram que a diversidade das plantas altera a composição bacteriana do solo (tipos de bactérias e frequência de ocorrência). Assim, como um dos possíveis efeitos das mudanças climáticas é sobre a diversidade de plantas, conseqüentemente, haverá interferência na comunidade microbiana.

A literatura dispõe de poucas informações sobre os efeitos das mudanças climáticas sobre doenças de plantas (Ghini, 2005; Pritchard & Amthor, 2005). Em relação ao controle biológico de doenças de plantas, praticamente não existem informações. Os poucos trabalhos sobre impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico foram realizados com insetos pragas (Goldson, 2007). Para Ward *et al.* (2007), um dos motivos é o fato dos insetos fornecerem serviços para os ecossistemas, como polinização e controle biológico, porém, além disso, as espécies introduzidas têm grande potencial para destruir a biodiversidade nativa.



Uma revisão de literatura sobre os efeitos de temperaturas extremas sobre parasitóides foi publicada por Hance *et al.* (2007). Segundo os autores, os impactos das mudanças climáticas serão provavelmente mais importantes em níveis tróficos superiores, que dependem da capacidade dos níveis tróficos inferiores de se adaptar às mudanças. Assim, os parasitóides e hiperparasitóides sofrerão impactos mais severos, já que representam o terceiro ou quarto nível. Os extremos de temperaturas altas ou baixas podem ser letais ou subletais, podem alterar o ciclo de desenvolvimento, o tamanho, a longevidade, a fecundidade, o processo reprodutivo, a mobilidade e outras características tanto do parasitóide quanto do inseto. Como consequências, são esperadas alterações na distribuição geográfica desses organismos e no controle biológico, com grande chance de aumento dos danos causados pelas pragas.

Percy *et al.* (2002), em um experimento de longa duração desenvolvido em FACE (“Free Air Carbon Dioxide Enrichment”), localizado em Aspen, EUA, com dominância de *Populus tremuloides*, estudaram o efeito de enriquecimento atmosférico com CO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> sobre a severidade de *Melampsora* (agente causal da ferrugem), a massa de pupas fêmeas de uma lagarta (*Malacosoma disstria*) e a abundância de afídeos e seus inimigos naturais. Os autores verificaram que o aumento de CO<sub>2</sub> não interferiu na severidade da ferrugem das folhas, o aumento de O<sub>3</sub> incrementou em quatro vezes a severidade da doença, enquanto que a mistura de CO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> aumentou a severidade em torno de três vezes. Em relação à massa de pupas, somente com o O<sub>3</sub> foi verificado aumento. Entretanto, o CO<sub>2</sub> e o O<sub>3</sub> isolados, ou em mistura, aumentaram a abundância da população de afídeos. Por outro lado, a abundância dos inimigos naturais não acompanhou essa tendência, sendo fortemente reduzida na presença de O<sub>3</sub> e apenas na testemunha foi maior do que a população de afídeos.

Também trabalhando em experimento tipo FACE para avaliar os efeitos sobre fungos saprófitas, Rezácová *et al.* (2005) verificaram que *Clonostachys rosea*, agente de controle biológico de *Botrytis* e outros patógenos, e *Metarrhizium anisopliae*, um dos mais importante entomopatógeno para controle de insetos pragas, mostraram-se fortemente associados com a cultura de trevo em ambiente com alta concentração de CO<sub>2</sub>. Os autores sugerem que a abundância dessas espécies de fungos pode indicar aumento da supressividade do solo a fungos fitopatogênicos e outras pragas. Em outro trabalho, Coviella & Trumble (2000) verificaram que folhas de algodão obtidas em ambiente com elevada concentração de CO<sub>2</sub> apresentaram maior relação C:N e, quando tratadas com *Bacillus thuringiensis*, estimularam o consumo por larvas de *Spodoptera exigua*, resultando em maior mortalidade da praga que em ambiente sem enriquecimento com o gás.

Predizer os efeitos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas é problemático e atualmente baseado em observações indiretas. Entretanto, com certeza, a vulnerabilidade dos agentes de biocontrole será maior com as mudanças climáticas, pois esse é um dos problemas da aplicabilidade dos antagonistas (Garrett *et al.*, 2006). Assim, este capítulo tem por objetivo discutir efeitos potenciais das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas, apesar das enormes incertezas, que podem acarretar em enganos na discussão. Embora uma das consequências diretas das modificações causadas pelas mudanças climáticas nas relações patógeno-hospedeiro seja na resistência genética

às doenças, pois muitas mudanças na fisiologia da planta podem alterar os mecanismos de resistência (Ghini, 2005), esse aspecto não será considerado neste capítulo. Assim, serão discutidos apenas os aspectos envolvendo os antagonistas no controle biológico de doenças. Os fatores das mudanças climáticas considerados são o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico, alterações de temperatura, precipitação e umidade e emissão de poluentes.

## **Patógenos Veiculados pelo Solo**

O solo é um sistema vivo no qual as plantas, os microrganismos e a fauna interagem mutuamente e com o ambiente abiótico (Verhoef, 2004). Na Figura 2 estão apresentados os organismos do solo, bem como sua importância ecológica e seu número aproximado. Esses organismos, além de suas funções naturais, interferem no controle biológico (Bettiol & Ghini, 2005), não só de patógenos veiculados pelo solo, mas também de patógenos da parte aérea, pela indução de resistência.

As três funções-chaves relacionadas com a qualidade do solo: dinâmica e mineralização da matéria orgânica, formação e/ou manutenção da estrutura do solo e diversidade das espécies, bem como o suporte e o controle da produção das plantas (Verhoef, 2004), são totalmente dependentes da atividade dos organismos do solo. As funções de suporte à vida, os processos e os indicadores de qualidade de solo estão apresentados na Tabela 1 (Verhoef, 2004). Todos os indicadores apresentados para estabelecer a qualidade do solo são organismos importantes no controle biológico natural e também na indução da supressividade do solo a doenças (Baker & Cook, 1974; Cook & Baker, 1983; Bettiol & Ghini, 2005). Assim, se as mudanças climáticas alterarem a qualidade do solo (aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e de outros gases, aumento ou redução da umidade e pH e aumento da temperatura) indiretamente estarão afetando o controle biológico natural. Entretanto, a sua quantificação não é tarefa simples, pois a avaliação do próprio controle biológico natural dificilmente pode ser realizada.

Os grupos de organismos, utilizados como indicadores da qualidade do solo, serão afetados pelas mudanças climáticas, pois de modo geral, todos sofrem influência do aumento da temperatura, de gases e regimes de chuvas. Assim, com essas alterações, possivelmente as atividades enzimáticas e a biodiversidade dos solos serão afetadas e, com isso, a deposição de matéria orgânica, o ciclo e a disponibilidade de nutrientes, a estrutura e a funcionalidade e, principalmente, a estabilidade do ecossistema solo. A disponibilidade de nitrogênio no solo, por exemplo, causa alterações na comunidade de organismos, pois afeta sua multiplicação, as atividades enzimáticas e outros processos, podendo alterar o equilíbrio microbiano existente e, com isso, afetar o controle biológico. Outro aspecto a ser considerado é a alteração no equilíbrio nutricional, pois os demais nutrientes, como potássio, cálcio e magnésio, poderão ser limitantes se não suplementados. A maior parte dos trabalhos realizados nesse assunto dizem respeito aos efeitos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico sobre a microbiota relacionada com a ciclagem de nutrientes, especialmente nitrogênio (Frederiksen *et al.*, 2001; Carnol *et al.*, 2002; Kanerva *et al.*, 2006; Reich *et al.*, 2006; Chung *et al.*, 2007).

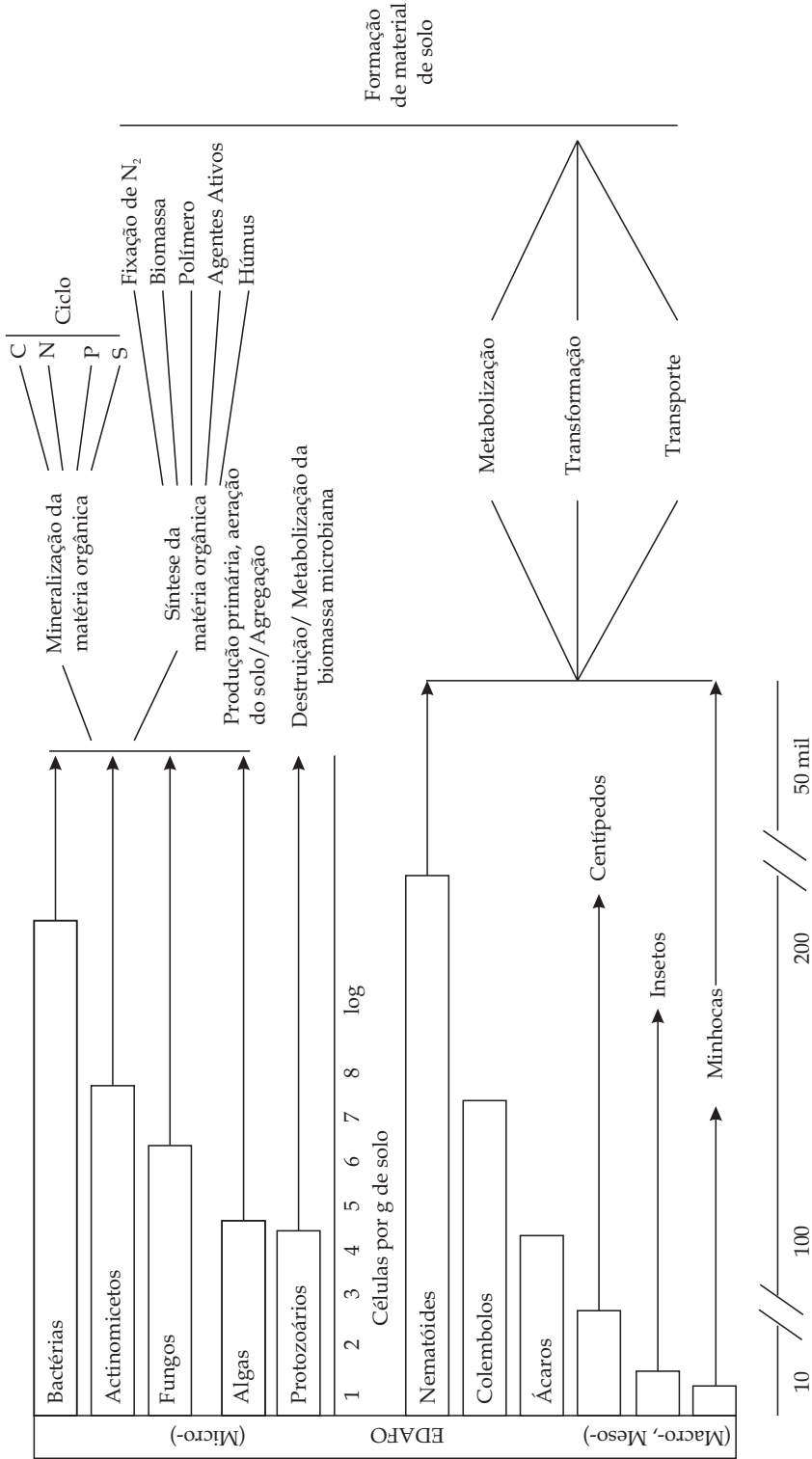


Figura 2. Organismos do solo, contagem aproximada e atividades ecológicas importantes (Verhoef, 2004).

**Tabela 1.** Sistema de indicador de qualidade de solo (Verhoef, 2004, modificado de Schouten *et al.*, 2001).

<b>Funções de suporte da vida</b>	<b>Processos</b>	<b>Indicadores</b>
Decomposição de matéria orgânica	Fragmentação	Vermes + Enchitrideos (1) Ácaros (2)
	Transformação da matéria orgânica	Metabolismo bacteriano (3) Cogumelos (4) Diversidade microbiana (5)
Ciclagem de nutrientes	Mineralização do nitrogênio	Interações tróficas (6) = 1+2+7+8+9+10 (em número e biomassa)
	Subprocessos - Atividade microbiana	Microrganismos (7) (bactérias e fungos)
	- Microbióvoros	Protozoários (8) Nematóides (9) Colembolos (10) Ácaros (2)
	Herbívoros de raízes Predação	Nematóides (+2+10) Ácaros (+9+10)
Biodisponibilidade de nutrientes para as plantas	Absorção de N-, P- e H <sub>2</sub> O Nitrificação	Fungos micorrízicos (4) Bactérias nitrificadoras (11)
Formação da estrutura do solo	Bioturbação + formação de agregados	Vermes + enchitrideos
Estabilidade do ecossistema do solo	Interações tróficas	Estrutura da comunidade = 1+2+7+8+9+10 (em número e biomassa)

A flutuação da comunidade de fungos decompositores associados à serapilheira de uma floresta de coníferas subalpinas no Japão foi avaliada por Osono & Takeda (2007), durante diferentes períodos do ano. Os autores verificaram que *Trichoderma viride* foi a espécie mais frequente e houve significativo efeito da temperatura sobre a ocorrência dos fungos. Além de afetar a capacidade de decomposição, o aumento da temperatura influencia a capacidade de competição e colonização desses microrganismos, resultando em mudanças nas comunidades do solo, fato que deve ocorrer na região, como consequência das mudanças climáticas.

A relação entre perda de biodiversidade e funções e serviços de ecossistemas foi estudada por Hunt & Wall (2002) por meio de simulação, utilizando um modelo para descrever a dinâmica trófica de grupos funcionais de organismos do solo de uma pastagem, sob interferência especialmente do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico. Seis dos quinze grupos funcionais de microrganismos e fauna do solo, excluídos individualmente, resultaram em 15% da alteração de abundância dos demais grupos e a eliminação de dois grupos (bactérias e fungos saprófitas) levou à extinção de outros grupos. Os autores concluíram que o ecossistema pode suportar a perda de alguns grupos, com poucos prejuízos porque pode ocorrer compensação pelos demais sobreviventes, entretanto essa previsão depende da natureza dos mecanismos de estabilização, os quais são pouco conhecidos.

Dinâmica semelhante deverá ser observada na comunidade de antagonistas a patógenos veiculados pelo solo, cuja eliminação de determinados grupos pode resultar na perda de supressividade se não houver a compensação pela atividade de outros grupos.

Rønn *et al.* (2002, 2003) estudaram os efeitos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> sobre a comunidade de organismos do solo cultivado com ervilha e trigo, respectivamente, e verificaram aumento no número de protozoários com o aumento da concentração desse gás. Por outro lado, Chakraborty *et al.* (1983) descreveram que os protozoários *Gephyramoeba*, *Mayorella*, *Saccamoeba* e *Thecamoeba* se alimentam de propágulos de *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* e *Cochliobolus sativus*. Posteriormente, Chakraborty (1983, 1985) e Dwivedi (1986) associaram a supressividade de solos ao mal-do-pé do trigo com a presença de protozoários. Também Habte & Alexander (1975) reportaram que protozoários reduziram, em torno de cinco vezes, a população de *Xanthomonas campestris* em solo. Anderson & Patrick (1978/1980) verificaram que amebas, além de perfurarem, inativaram propágulos de *Cochliobolus sativus* e *Thielaviopsis basicola* e concluíram que esses organismos têm um importante papel sobre a ecologia dos fungos habitantes do solo e no seu controle biológico. Resultados semelhantes foram obtidos por Homma & Ishii (1984), os quais observaram perfurações em hifas de *Rhizoctonia solani* por amebas (*Arachnula impatiens*). Dessa forma, os resultados de Rønn *et al.* (2002, 2003) são positivos para a supressividade dos solos às doenças.

Hoitink & Fahy (1986) discutiram as bases do controle de patógenos habitantes do solo com a incorporação de matéria orgânica compostada. Esses autores consideraram a atividade microbiana a variável mais importante para a obtenção da supressividade. A liberação de substâncias fungitóxicas a determinados patógenos pela decomposição da matéria orgânica e os efeitos sobre os ciclos de nitrogênio e carbono no solo também estão relacionados com a obtenção de supressividade. Na comunidade microbiana estão envolvidos antagonistas como *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* e outros. Chen *et al.* (1988ab) e Inbar *et al.* (1991) encontraram correlação positiva entre a supressividade de substratos a *Pythium ultimum*, causador do tombamento de plântulas de pepino, e atividade microbiana total. Assim, toda e qualquer mudança climática que afete a qualidade dos solos causará alteração, que pode ser positiva ou negativa, na supressividade do solo a doenças de plantas.

A estabilidade do ecossistema solo é o principal fator relacionado à ocorrência e à severidade de patógenos veiculados pelo solo. Considerando os conhecimentos existentes sobre os efeitos das mudanças climáticas sobre as doenças de plantas, é impossível fazer uma previsão adequada. Entretanto, pode-se assumir que a tendência é aumentar a importância do controle biológico natural dos patógenos, pois ele depende fundamentalmente das interações existentes no solo, uma vez que as atividades microbianas devem ser intensificadas com o aumento da temperatura e de deposição de matéria orgânica pelas plantas. Também o aumento da deposição de nitrogênio no ambiente intensificará a atividade microbiana. Boland *et al.* (2004), discutindo os possíveis efeitos das mudanças climáticas em doenças de plantas para Ontário, Canadá, consideraram que, para patógenos do solo, um dos aspectos fundamentais para a redução ou manutenção dessas doenças aos níveis atuais é o aumento da competição microbiana. Entretanto, os mesmos autores

consideraram outros aspectos que podem levar ao aumento dessas doenças.

Um dos indicadores utilizados, os fungos micorrízicos, além de desempenhar importante papel na nutrição das plantas, também são importantes para o controle de doenças. Em solos com condições menos favoráveis são evidentes os efeitos positivos das micorrizas no desenvolvimento das plantas. Apesar de resultados contraditórios quanto aos efeitos das mudanças climáticas nos fungos micorrízicos (Monz *et al.*, 1994; Rillig & Allen, 1998; Staddon *et al.*, 2002), o papel desses fungos é de grande importância no controle de patógenos veiculados pelo solo e na indução de defesa do hospedeiro. Auer & Krügner (1991), Zambolim *et al.* (1991) e Rodrigues-Kabana (1994) discutem amplamente o importante papel das micorrizas (endo e ectomicorrizas) na saúde das plantas.

Staddon *et al.* (2002) concluíram que não há evidências de que a elevação do CO<sub>2</sub> atmosférico afete os fungos micorrízicos, além da interferência sobre o crescimento do hospedeiro. O potencial dos efeitos indiretos, mediado, por exemplo, pelo aumento dos carboidratos solúveis nas raízes, não está claramente demonstrado. Entretanto, quando se considera as alterações no ecossistema, os efeitos da elevação do CO<sub>2</sub> sobre as micorrizas podem ser mediados por fatores bióticos e abióticos (Tabela 1). Assim, como os efeitos da elevação de CO<sub>2</sub> nas plantas são espécie-específicos, se a estrutura da comunidade de plantas for alterada, poderá causar mudanças na comunidade de fungos micorrízicos. Staddon *et al.* (2002) consideraram esse o aspecto mais importante. Esses autores afirmaram que o aumento da temperatura pode interferir diretamente nos fungos micorrízicos, pois as atividades enzimáticas são dependentes desse fator e, portanto, deverá influenciar no papel das micorrizas nas plantas. Além disso, as alterações causadas pela temperatura na comunidade de plantas também devem ser estudadas (Staddon *et al.*, 2002). A umidade do solo é outro fator considerado, pois as micorrizas são dependentes dessa variável climática, que é alterada com o aumento da temperatura.

As mudanças climáticas deverão causar alterações na estrutura das espécies dominantes em florestas e, com isso, também nas espécies de fungos ectomicorrízicos, haja vista a associação com determinadas espécies de árvores. Assim, as mudanças climáticas com certeza alterarão a distribuição das espécies de fungos ectomicorrízicos, pois esses apresentam comportamentos diferentes frente às alterações da temperatura, umidade, concentração de CO<sub>2</sub>, disponibilidade de nutrientes e do aumento de outros gases na atmosfera, como o O<sub>3</sub>.

Como cada espécie de fungo pode apresentar diferente comportamento no controle de doenças de plantas (Auer & Krügner, 1991), não é possível prever o que ocorrerá com essa interação em relação ao controle natural de doenças. Lonsdale & Gibbs (2002) discutiram os possíveis efeitos de mudanças climáticas nas doenças fúngicas em árvores e também na ocorrência de micorrizas. Broadmeadow & Randle (2002) afirmaram que com o aumento da exsudação de açúcares pelas raízes com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, ocorre aumento das atividades das micorrizas. Assim, esse é mais um aspecto que necessita ser estudado para avaliar o papel da nova estrutura e funcionamento das micorrizas nos solos sobre as doenças de plantas, principalmente em espécies florestais. Além disso, Drigo *et al.* (2007) alertam para o fato de que os impactos do aumento da concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico

sobre a comunidade microbiana da rizosfera depende da espécie de planta envolvida e do tipo de solo.

Um dos exemplos bem conhecidos e discutidos de sucesso de controle biológico de patógenos veiculados pelo solo é o controle de *Phytophthora* em abacateiro, com a adição de matéria orgânica na superfície do solo. Com a introdução da matéria orgânica, existe a manutenção de um equilíbrio do solo e a ação de microartrópodos (colembolos), fungos e bactérias. Assim, com o possível aumento da temperatura média, ocorrerá uma decomposição da matéria orgânica mais acelerada, bem como a alteração no equilíbrio entre os organismos, sendo improvável a manutenção do mesmo equilíbrio. As consequências são desconhecidas, mas, se mantidas as características da planta, bem como o nível de controle, possivelmente o aporte de matéria orgânica no sistema deverá ser incrementado para suprir a demanda dos organismos.

Uma das expectativas de Siqueira *et al.* (2001) é que poderá ocorrer maior acidificação dos solos com as mudanças climáticas. Se essa expectativa for confirmada, com certeza o controle biológico natural de patógenos de solo passará por alterações, pois a biodiversidade poderá ser reduzida (Nosengo, 2003). Entre os agentes de controle biológico existentes naturalmente nos solos, encontram-se os actinomicetos.

Esses organismos, como todos os demais microrganismos do solo, são dependentes do pH. Assim, uma redução na atividade desse grupo de organismo possivelmente levará a um aumento de problemas com doenças causadas por *Fusarium*. Entretanto, há necessidade de se considerar se essa potencial redução no pH do solo não será compensada pelo aumento das atividades microbianas.

## Patógenos da Parte Aérea

A comunidade microbiana da filosfera consiste, basicamente, de bactérias e leveduras. A sucessão ecológica na filosfera inicia com as bactérias, posteriormente com o domínio das leveduras e, finalmente, os fungos relacionados com a senescência (Blakeman, 1985). Assim, as populações desses organismos são alteradas com a idade das plantas, as fontes de nutrientes na filosfera e com as estações do ano. Além disso, os tratos culturais podem alterar a comunidade de organismos nesse ambiente. Podem também ser abruptamente alteradas ocasionalmente por algum evento ambiental (Smith, 1976). Essas alterações, no tempo e por fatores antrópicos, causam alterações na ocorrência de doenças de plantas, pois são importantes organismos relacionados com o equilíbrio na filosfera, competindo com os fitopatógenos, produzindo hormônios de crescimento e fitoalexinas, fixando nitrogênio, degradando substâncias presentes no filoplano, entre outras atividades.

O ambiente na filosfera apresenta maior variabilidade do que o ambiente na rizosfera. Como a planta, os patógenos e a comunidade microbiana associada à

filosfera são influenciados pelo ambiente, o controle biológico da filosfera é influenciado tanto pelo clima, quanto pelo microclima da superfície da planta que estão em constantes alterações. Dessa forma, as mudanças climáticas influenciarão mais acentuadamente o controle biológico na parte aérea do que do solo, pois os organismos nesse ambiente são mais expostos às alterações de umidade e temperatura e às radiações. Além disso, o aumento da concentração de CO<sub>2</sub> e de outros poluentes poderá causar alterações nas características químicas dos microsítios das folhas, na disponibilidade de nutrientes aos microrganismos e também nas características de hospitabilidade aos bioagentes.

Segundo Blakeman (1985), a umidade relativa do ar e da filosfera, possivelmente sejam os fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a sobrevivência de organismos na superfície foliar da planta. Como a expectativa é de que as plantas apresentem um maior desenvolvimento com o aumento da concentração de CO<sub>2</sub>, poderá ocorrer aumento da densidade da copa e, assim, a umidade nesse ambiente ser menos afetada pelas mudanças climáticas. Se isso ocorrer, provavelmente, os organismos agentes de controle biológico natural desse ambiente serão menos afetados. Entretanto, precisam ser consideradas as alterações como um todo e as interações entre elas e os agentes de biocontrole. Por exemplo, em algumas regiões, com severas alterações no regime das chuvas, a umidade relativa extremamente baixa pode criar condições inóspitas para os agentes de biocontrole.

Saunders (1971) afirmou que os efeitos dos poluentes na superfície da folha e em seus ambientes são similares a alguns efeitos causados por agrotóxicos, alterando a composição da microbiota por eliminação de membros sensíveis da comunidade e por prover espaço adicional para os membros resistentes. Entretanto, quando afirmaram isso, em setembro de 1970, em simpósio realizado na Universidade de Newcastle, Inglaterra, os problemas com poluentes estavam num grau consideravelmente menor do que os atuais.

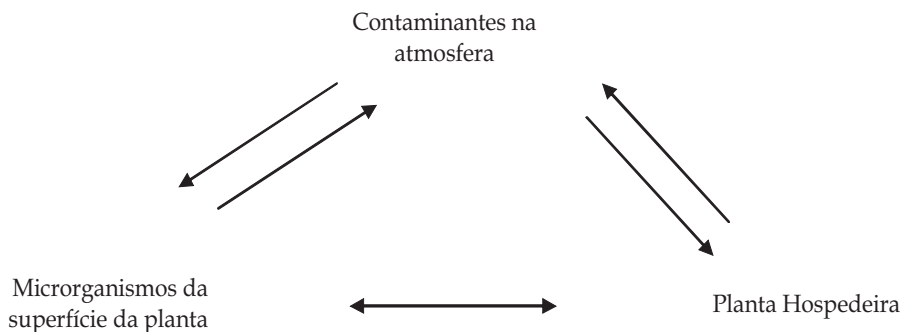
Smith (1976), no capítulo intitulado “Air pollution – effects on the structure and function of plant-surface microbial-ecosystems”, do livro editado por Dickinson & Preece (1976) “Microbiology of aerial plant surfaces”, marco na microbiologia da parte aérea das plantas, discutiu que as ramificações da poluição do ar podem ser globais na natureza, mas que efeitos agudos são geralmente regionais ou fenômenos locais associados a estradas, instalações comerciais ou industriais e áreas urbanas. Entretanto, nesse período ainda não se discutiam os efeitos das mudanças climáticas globais causadas pelas atividades antrópicas.

Os poluentes podem reduzir o crescimento dos microrganismos e estimular ou matar espécies individualmente, reduzindo ou aumentando a biomassa microbiana (Smith, 1981). Dessa forma, ocorre alteração na microbiota da superfície foliar, aumentando ou diminuindo as doenças, devido às mudanças nas relações com os saprófitas. Ainda de acordo com Smith (1981), microrganismos que normalmente se desenvolvem na superfície das plantas podem ser especialmente sujeitos à influência de poluentes. Assim, se a comunidade de organismos agentes de controle biológico natural que se desenvolve nas folhas for afetada pelas mudanças climáticas, com certeza ocorrerão alterações no controle biológico natural. Entretanto, se a alteração será positiva ou negativa, é extremamente difícil de ser feita a previsão com o atual nível de conhecimento.



Os poluentes do ar influenciam os sistemas biológicos direta e indiretamente (Figura 3). A interação entre os efeitos deve ser especialmente importante na natureza onde misturas de poluentes são comuns (Smith, 1976). Didaticamente, Smith (1976) divide em três classes as relações entre contaminantes atmosféricos e microrganismos na superfície da plantas: sob exposição à baixa, intermediária e alta dose dos poluentes (Tabela 2). Para essas classes, o autor apresenta as respostas dos microrganismos, os impactos no ecossistema microbiano, bem como a resposta do hospedeiro a essas exposições. Smith (1976) conclui que o filoplano e outras superfícies das plantas provêm habitats para vários microrganismos que interferem nos compartimentos atmosféricos e vegetativos, e que nessa posição os microrganismos são expostos aos poluentes e vulneráveis às suas influências. Assim, aplicando os conceitos de ecossistemas à microbiota do filoplano, é possível estabelecer as potenciais alterações na estrutura e na função da comunidade microbiana na superfície foliar causadas pelos poluentes. Já em 1976, ele concluiu que o aumento do entendimento dessas relações é requerido e justificado. Mas, até o momento, dispõe-se de poucas informações sobre os efeitos dos poluentes sobre a comunidade de organismos na superfície foliar que permita tirar conclusões sobre seus efeitos no controle biológico de doenças de plantas. Dessa forma, serão feitas especulações sobre os potenciais efeitos.

Skidmore (1976) considera que, nas folhas de uma variedade de plantas de clima temperado, as espécies de fungos que comumente ocorrem são membros das Cryptococcaceae (*Rhodotorula*, *Cryptococcus* e *Torulopsis*), *Sporobolomycetaceae* (*Sporobolomyces* e *Tilletiopsis*) e *Aureobasidium pullulans*, na forma leveduriforme. Atualmente, o conhecimento indica o papel dessas leveduras no controle de patógenos da parte aérea, principalmente por competição.



**Figura 3.** Interação de contaminantes na atmosfera, microrganismos na superfície das plantas e plantas hospedeiras num complexo modelo na natureza (Smith, 1976).

**Tabela 2.** Influência da poluição do ar no ecossistema microbiano da superfície da planta (Smith, 1976).

<b>Classe</b>	<b>Dose da poluição do ar</b>	<b>Resposta do microrganismo</b>	<b>Impacto sobre o ecossistema microbiano</b>	<b>Reação da planta hospedeira</b>
I	Baixa	1. Ação sobre as fontes de contaminantes do ar 2. Ação sobre a diminuição de contaminantes do ar	1. nenhum efeito ou potencialmente alguma influência aleopática 2. Nenhuma ou mínima alteração fisiológica ou potencialmente alguma fertilização ou estímulo	
II	Média	1. Metabolismo anormal, alteração na pigmentação, na morfologia e na atividade enzimática 2. Redução na reprodução (redução na competitividade) a) redução na produção de esporo ou dispersão b) redução ou decaimento na germinação do esporos 3.Redução no crescimento (produtividade e competitividade reduzidas) a) atraso vegetativo b) inibição vegetativa	1. Perturbação não significativa ou muito pequena  2. Alteração na composição e sucessão das espécies  3. Redução na biomassa microbiana, alteração na estrutura e na função (fluxo de energia, ciclagem de nutrientes, competição e sucessão)	Alteração na microbiota da superfície, alteração na relação com saprófitas aumento/redução de doenças causadas por parasitas.
III	Alta	1. Estimulo de espécies individuais  2. Aguda morbilidade de espécies individuais  3. Mortalidade de espécies individuais	1. Aumento da biomassa microbiana, alteração na estrutura e função 2. Redução na biomassa microbiana, alteração na estrutura e função  3. Simplificação	Alteração na microbiota da superfície, alteração na relação com saprófitas, aumento/redução de doença causadas por parasitas.

Valarini *et al.* (2006), utilizando discos de folhas para determinar a comunidade de leveduras no filoplano de plantas, verificaram que folhas de ipê (*Tabebuia ipê*), originárias de regiões centrais e próximas de cidades, possuíam um reduzido número de colônias de leveduras quando comparadas com as folhas originárias de regiões rurais. Machado & Bettiol (2008), com a mesma metodologia, não detectaram leveduras em folhas de lírio tratadas com diversos agrotóxicos, por outro lado, a comunidade de leveduras foi alta em folhas originárias de plantas de um sistema onde não são utilizados agrotóxicos. Esses fatos demonstram que ocorrem alterações, na filosfera, na presença de poluentes de diversas naturezas. Essas alterações são importantes para o controle biológico natural, pois as leveduras desempenham um importante papel no controle biológico de doenças do filoplano e são sensíveis aos poluentes.

As leveduras agem, preferencialmente, por competição por nutrientes e por indução de resistência. Fokkema & Van der Meulen (1976) obtiveram redução de 50% ou mais na infecção de folhas de trigo por *Septoria nodorum* com aplicação de *Sporobolomyces roseus*, *Aureobasidium pullulans* e *Cryptococcus laurentii* var. *florescens*, residentes na filosfera de trigo. Também Luz (1985) verificou que leveduras do filoplano controlaram manchas fúngicas foliares de trigo tanto em casa-de-vegetação, como em campo. O potencial de leveduras em induzir resistência de plantas a fungos fitopatogênicos foi discutido por Stangarlin & Pascholati (1994) e outros.

A indução de resistência do hospedeiro é o mecanismo que deve estar relacionado com a maior porcentagem do controle biológico natural na filosfera. O nível de resistência das plantas pode ser alterado pelas condições ambientais (Pascholati & Leite, 1994). Em todos os cenários de mudanças climáticas existe uma tendência de aumento da temperatura do planeta em muitas regiões. Esse aumento, com certeza, alterará a resposta das plantas às doenças, seja devido à própria composição genética do hospedeiro, seja por alterações causadas na comunidade de organismos que induzem resistência. Mayama *et al.* (1975) verificaram que cultivares de trigo com o alelo *Sr6* para resistência a *Puccinia graminis*, exibem alta resistência a 20 °C, porém apresentam suscetibilidade ao patógeno a 25 °C.

Ribeiro *et al.* (1978) verificaram que o tratamento de folhas de café inoculadas com *Hemileia vastatrix* por 4 h a 40 °C, durante quatro dias consecutivos, preveniu o desenvolvimento de uredíniosporos em cultivar suscetível. Rodrigues Junior (1984) também discutiu as alterações na resistência e na suscetibilidade de cafeeiros submetidos a diferentes temperaturas.

Além do aspecto da funcionalidade dos genes relacionados com a resistência do hospedeiro e da agressividade do patógeno, precisa ser considerada a alteração da funcionalidade dos genes dos antagonistas. Assim, possivelmente, os organismos que têm a ação relacionada com a produção de alguma substância poderão sofrer maiores consequências do que aqueles que agem por predação e competição.

Bradshaw & Holzapfel (2006) afirmaram que o rápido aquecimento climático pode selecionar geneticamente diversos grupos de organismos. Essas alterações nas populações afetam os ciclos dos principais eventos da vida, isto é: desenvolvimento, reprodução, dormência e migração. Os microrganismos que apresentam ciclos de vida curtos e grandes populações, provavelmente, se adaptarão rapidamente. Entretanto, não se tem conhecimento de como será a nova estrutura e o novo funcionamento das interações entre hospedeiro-patógeno-agentes de biocontrole-ambiente.

## **Antagonistas Comercializados**

Como os microrganismos são dependentes da temperatura, da umidade e de outros fatores ambientais, pode-se afirmar que tanto a diversidade, quanto as atividades dos antagonistas comercializados serão alteradas com as mudanças climáticas. Por exemplo, o fator temperatura pode inviabilizar a multiplicação, a distribuição geográfica, bem como a produção de metabólitos dos antagonistas, assim como a sua sobrevivência. Dentre os antagonistas bem estudados, encontram-se as bactérias do gênero *Bacillus*. Essas bactérias, apesar de serem afetadas pela

temperatura, têm uma faixa ótima de desenvolvimento relativamente ampla. Assim, esse seria um grupo de organismos que possivelmente não teria sérios problemas com o aquecimento global. Logicamente, haveria uma alteração na sua distribuição. *Trichoderma* spp., que também têm isolados que crescem em ampla faixa de temperatura, possivelmente, não apresentarão problemas de eficiência. Entretanto, para os dois organismos, o efeito da umidade é importante. Por outro lado, em organismos mais sensíveis à temperatura, como *Coniothyrium* (Melo, 1998), uma elevação de 3 °C poderá afetar a sua sobrevivência e a capacidade de parasitismo. *Clonostachys rosea*, antagonista comumente encontrado em diferentes condições climáticas (Sutton *et al.*, 1997), dependendo da região, poderá ter sua eficiência no controle de doenças alterada, pois a faixa adequada está situada entre 15 e 25 °C (Sutton *et al.*, 1997; Morandi *et al.*, 2001).

O controle biológico pela introdução massal de bioagentes de controle deverá ser beneficiado nas regiões com maior período de temperaturas adequadas para o seu desenvolvimento. Entretanto, nas regiões com extremos de temperatura, diversos agentes se tornarão inadequados para uso. Assim, obrigatoriamente, para se ter sucesso com essa modalidade de controle haverá maior necessidade de selecionar organismos devidamente adaptados para essas regiões. Tal aspecto está sendo trabalhado pelas empresas produtoras de agentes de biocontrole. Entretanto, ocorrerão problemas se, aliada à temperatura, ocorrer a redução da precipitação e, como consequência maiores períodos de seca. Assim, será exigida uma seleção de antagonistas que considere esses aspectos e o desenvolvimento de práticas culturais que permitam a efetiva atuação desses microrganismos. Além disso, as formulações dos produtos biológicos deverão considerar essas novas situações.

## **Controle Biológico em Sistemas Convencional e Orgânico**

A proteção de plantas com métodos convencionais, por meio do uso de agrotóxicos, apresenta características bastante atraentes, como a simplicidade, a previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema para a sua aplicação. Por exemplo, para obter-se sucesso com a aplicação de um fungicida de amplo espectro é importante o conhecimento de como aplicar o produto, sendo necessárias poucas informações sobre a ecologia e a fisiologia das espécies envolvidas. Assim, Stacey (2003) acredita que o uso de fertilizantes químicos, de agrotóxicos e de variedades geneticamente modificadas poderão prover algum tampão às mudanças climáticas na agricultura convencional. Muitos estudos de controle biológico adotam uma abordagem semelhante ao controle químico, em que é enfatizado o encontro entre patógeno-antagonista, sendo inclusive a forma de se realizar o controle biológico em sistemas convencionais. Nesses casos, após a introdução, por exemplo, de um agente microbiano de biocontrole, haverá o seu estabelecimento em um nicho, seguido da interação com o organismo alvo e outras espécies de organismos. Essas complexas interações são fundamentais para o sucesso do controle, devendo ser analisadas de modo holístico e consideradas a longo, e não em curto prazo. Assim sendo, há a necessidade de um amplo conhecimento da ecologia de sistemas (Atkinson & McKinlay, 1995). Entretanto, uma adequada seleção ou um melhoramento de antagonistas para o novo ambiente poderá manter o sucesso da técnica.

Em contraste com a agricultura convencional, os sistemas alternativos, entre eles o orgânico, buscam obter vantagens das interações de ocorrência natural. Os sistemas alternativos dão ênfase ao manejo das relações biológicas, como a antibiose, a competição, a predação e o parasitismo, e a processos naturais, como a fixação biológica do nitrogênio ao invés do uso de métodos químicos. O objetivo é aumentar e sustentar as interações biológicas nas quais a produção agrícola está baseada, ao invés de reduzir e simplificar essas interações (National Research Council, 1989). Dessa forma, Stacey (2003), discutindo os possíveis efeitos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de pragas em sistemas orgânicos em clima temperado, considera que a agricultura orgânica poderá ser mais afetada do que a convencional, isso por ser mais dependente das fontes internas do sistema e, conseqüentemente, mais sensível às mudanças climáticas, pois potencialmente todas as interações poderão ser afetadas. Entretanto, precisa ser considerado que, devido à complexidade dos sistemas orgânicos, com numerosas interações mantendo o equilíbrio do sistema, ele poderá ser menos afetado por essas mudanças.

A ocorrência de patógenos de solo em cultivo orgânico em clima tropical, possivelmente, não será afetada pelas mudanças climáticas, uma vez que, graças ao considerável aporte de matéria orgânica ao solo, a atividade microbiana é intensa, tornando essas doenças pouco limitantes nesse sistema. Por outro lado, os patógenos da parte aérea poderão sofrer maiores interferências, porém dependentes da fisiologia do hospedeiro, pois também para esses patógenos a complexidade será fator indispensável para evitar perdas. Entretanto, as indicações de Stacey (2003) sobre a necessidade de estudos nas condições ecológicas de cultivo para avaliar o efeito potencial das mudanças climáticas sobre o controle biológico são indispensáveis para ambos os sistemas.

Segundo Bettiol & Ghini (2003), o desenvolvimento da proteção de plantas, em sistemas alternativos de cultivo com maior grau de sustentabilidade, requer estudos sobre a estrutura e o funcionamento dos agroecossistemas, com atenção especial às condições nutricionais e à biota do solo, à biodiversidade funcional, à elevação dos teores de matéria orgânica do solo e a outros fatores que permitam um adequado manejo dos sistemas produtivos. Esses aspectos serão ainda mais importantes nos cenários climáticos futuros.

## Considerações Finais

Um trabalho detalhado sobre o efeito de condições climáticas sobre a eficiência de agentes de controle biológico foi realizado por Warwick (2001), que demonstrou os efeitos do regime de chuva e da hora do dia de aplicação de *Acremonium vittelinum* e *Acremonium persicinum* para o controle da lixa-do-coqueiro causada por *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*. Porém, para a maioria dos antagonistas, não há informações. Trabalhos nessa área serão importantes para a manutenção da eficiência do controle biológico. Além disso, é necessário conhecer quais serão as respostas das doenças de plantas a essas mudanças. Essas respostas é que permitirão conclusões sobre o que poderá acontecer ao biocontrole, tanto natural, quanto pela introdução de bioagentes.

Mudanças climáticas forçam as espécies de todos os seres vivos a se ajustar ou se adaptar. Entretanto, como as mudanças climáticas estão ocorrendo num espaço de tempo relativamente curto, necessita ser considerado se as espécies não serão eliminadas antes de se adaptar às novas condições. Talvez não haja tempo suficiente para a adaptabilidade das plantas cultivadas pela agricultura e também para os organismos que co-evoluíram com elas, como os fitopatógenos e os agentes de biocontrole.

A previsão do que ocorrerá a um ecossistema com a introdução de qualquer fonte de mudança não é uma tarefa simples, pois todo o sistema sofre alterações na tentativa de caminhar para um equilíbrio. No caso de mudanças climáticas e suas alterações nas comunidades de organismos tanto do solo, como da parte aérea das plantas, a previsão está muito longe de ser visualizada. Assim, nesse momento, qualquer que seja a conclusão, as incertezas são enormes. Apesar disso, pode-se afirmar que as mudanças climáticas serão benéficas para o controle biológico, tanto natural, quanto ao introduzido, pois as atenções da sociedade para os problemas ambientais exigirão o caminhar em direção a um determinado equilíbrio. Mesmo que não se conheça, corretamente, qual equilíbrio deseja-se atingir, a tendência é minimizar o lançamento de poluentes. Com isso, o equilíbrio biológico dos sistemas agrícolas será beneficiado, levando a um aumento da complexidade do sistema e, conseqüentemente, ao controle biológico. Para tanto, especialistas das diferentes áreas relacionadas com agricultura precisam ir além de suas disciplinas e posicionar os impactos das mudanças climáticas em um contexto mais amplo, que envolve todo o agroecossistema.

## Referências

- Anderson, T.R. & Patrick, Z.A. Mycophagous amoeboid organisms from soil that perforate spores of *Thielaviopsis basicola* and *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 68: 1618-1626. 1978.
- Anderson, T.R. & Patrick, Z.A. Soil vampyrellid amoebae that cause small perforations in conidia of *Cochliobolus sativus*. *Soil Biology & Biochemistry* 12: 159-167. 1980.
- Atkinson, D. & McKinlay, R.G. Crop protection in sustainable farming systems. In: McKinlay, R.G.; Atkinson, D. (Eds.) *Integrated crop protection: towards sustainability*. Farnham. British Crop Protection Council. 1995. pp. 483-488. (BCPC Symposium Proceedings, 63).
- Auer, C.G. & Krugner, T.L. Potencial de controle de doenças de plantas com fungos ectomicorrízicos. In: Bettiol, W. (Ed.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. pp. 71-85.
- Baker, K.F. & Cook, R.J. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco. W. Freeman. 1974.
- Bettiol, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Ed.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. pp. 1-5.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) *Métodos alternativos de controle fitossanitário*. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 79-95.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Solos supressivos. In: Micherref, S.J.; Andrade, D.E.G.T. & Menezes, M. (Eds.) *Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais*. Recife. UFRPE. 2005. pp. 125-152.
- Blakeman, J.P. Biological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. In: Windels, C.E. & Lindow, S.E. (Eds.) *Biological control on the phylloplane*. St Paul. APS. 1985. pp. 6-30.
- Boland, G.J.; Melzer, M.S.; Hopkin, A.; Higgins, V. & Nassuth, A. Climate change and plant diseases in Ontario. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 335-350, 2004.

- Bradshaw, W.E. & Holzapfel, C.M. Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 312: 1477-1478. 2006.
- Broadmeadow, M. & Randle, T. The impacts of increased CO<sub>2</sub> concentrations on tree growth and function. In: Broadmeadow, M. (Ed.). *Climate change: impacts on UK forests*. Edinburgh. ICF. 2002. pp. 119-148.
- Canadell, J.G.; Le Quéré, C.; Raupach, M.R.; Field, C.B.; Buitenhuis, E.T.; Ciais, P.; Conway, T.J.; Gillett, N.P.; Houghton, R.A. & Marland, G. Contributions to accelerating atmospheric CO<sub>2</sub> growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks. *PANS* 104<sup>2</sup>: 1866-18870. 2007.
- Carnol, M.; Hogenboom, L.; Jach, M.E.; Remacle, J. & Ceulemans, R. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> in open top chambers increases net nitrification and potential denitrification. *Global Change Biology* 8: 590-598. 2002.
- Chakraborty, S. Population dynamics of amoebae in soils suppressive and non-suppressive to wheat take all. *Soil Biology & Biochemistry* 15: 661-664. 1983.
- Chakraborty, S. Survival of wheat take-all fungus in suppressive and non-suppressive soils. *Pedobiologia*, 28: 13-18. 1985.
- Chakraborty, S.; Old, K.M. & Warcup, J.H. Amoebae from a take-all suppressive soil which feed on *Gaeumannomyces graminis tritici* and other soil fungi. *Soil Biology & Biochemistry* 15: 17-24. 1983.
- Chen, W.; Hoitink, H.A. J. & Madden, L.V. Microbial activity and biomass in container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 78: 1447-1450. 1988a.
- Chen, W.; Hoitink, H.A.J.; Schmitthenner, F. & Tuovinen, O. H. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 78: 314-322. 1988b.
- Chung, H.G.; Zak, D.R.; Reich, P.B. & Ellsworth, D.S. Plant species richness, elevated CO<sub>2</sub>, and atmospheric nitrogen deposition alter soil microbial community composition and function. *Global Change Biology* 13: 980-989. 2007.
- Coakley, S.M.; Scherm, H. & Chakraborty, S. Climate change and plant disease management. *Annual Review of Phytopathology* 37: 399-426. 1999.
- Cook, R.J. Biological control of the pathogens: theory to application. *Phytopathology* 75: 25-29. 1985.
- Cook, R.J. & Baker, K.F. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St. Paul. APS. 1983.
- Coviella, C.E. & Trumble, J.T. Effect of elevated atmospheric carbon dioxide on the use of foliar application of *Bacillus thuringiensis*. *Biocontrol* 45: 325-336. 2000.
- Drigo, B.; Kowalchuk, G.A.; Yergeau, E.; Bezemer, T.M.; Boschker, H.T.S. & Van Veen, J.A. Impact of elevated carbon dioxide on the rhizosphere communities of *Carex arenaria* and *Festuca rubra*. *Global Change Biology* 13: 2396-2410. 2007.
- Dwivedi, R.S. Role of soil amoebae in take-all decline of wheat. *Indian Phytopathology* 39: 550-560. 1986.
- Fokkema, N.J. & Van Der Meulen, F. Antagonism of yeast like phyllosphere fungi against *Septoria nodorum* on wheat leaves. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 82: 13-16. 1976.
- Frederiksen, H.B.; Ronn, R. & Christensen, S. Effect of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and vegetation type on microbiota associated with decomposing straw. *Global Change Biology* 7: 313-321. 2001.
- Garrett, K.A.; Dendy, S.P.; Frank, E.E.; Rouse, M.N. & Travers, S.E. Climate change effects on plant disease: Genomes to ecosystems. *Annual Review of Phytopathology* 44: 489-509. 2006.
- Ghini, R. *Mudanças Climáticas Globais e Doenças de Plantas*. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2005.
- Goldson, S.L. Special example 2: climate change and biological control. In: Newton, P.C.D.; Carran, R.A.; Edwards, G.R. & Niklaus, P.A. (Eds.) *Agroecosystems in a changing climate*. Boca Raton. CRC Press. 2007. pp. 329-332.
- Grüter, D.; Schmid, B. & Brandl, H. Influence of plant diversity and elevated atmospheric carbon dioxides level on belowground bacterial diversity. *BMC Microbiology* 6: 68-75. 2006. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/6/68>>.

- Habte, M. & Alexander, M. Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. *Applied Microbiology* 29: 159-164. 1975.
- Hance, T.; Van Baaren, J.; Vernon, P. & Boivin, G. Impact of extreme temperatures on parasitoids in a climate change perspective. *Annual Review of Entomology* 52: 107-126. 2007.
- Hansen, J.; Sato, M.; Ruedy, R.; Lo, K.; Lea, D.W. & Medina-Elizade, M. Global temperature change. *PANS* 103: 14288-14293. 2006.
- Hoitink, H.A.J. & Fahy, P.C. Basis for the control of soilborn plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology* 24: 93-114. 1986.
- Homma, Y. & Ishii, M. Perforation of hyphae and sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kuhn by mycophagous soil amoebae from vegetable field soils in Japan. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 50: 229-240. 1984.
- Hunt, H.W. & Wall, D.H. Modelling the effects of loss of soil biodiversity on ecosystem function. *Global Change Biology* 8: 33-50. 2002.
- Inbar, Y.; Boehm, M.J. & Hoitink, H.A.J. Hydrolysis of fluorescein diacetate in sphagnum peat container media for predicting suppressiveness to damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Soil Biology & Biochemistry* 23: 479-483. 1991.
- IPCC. *Climate Change 2007: the physical science basis*. Cambridge. Cambridge University Press. 2007. 996p. (IPCC Assessment Report, 4).
- Kanerva, T.; Palojärvi, A.; Rämö, K.; Ojanpera, K.; Esala, M. & Manninen, S. A 3-year exposure to CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub> induced minor changes in soil N cycling in a meadow ecosystem. *Plant and Soil* 286: 61-73. 2006.
- Lonsdale, D. & Gibbs, J. Effects of climate change on fungal diseases of trees. In: Broadmeadow, M. (Ed.) *Climate change: impacts on UK forests*. Edinburgh. ICF. 2002. pp. 83-97.
- Luz, W. C. Efeito de microrganismos do filoplano sobre as manchas fúngicas foliares de trigo. *Fitopatologia Brasileira* 10: 79-84. 1985.
- Machado, M.A. & Bettiol, W.
- Mayama, S.; Daly, J.M.; Rehfeld, D.W. & Daly, C. Hypersensitive response of near-isogenic wheat carrying the temperature-sensitive *Sr6* allele for resistance to stem rust. *Physiological Plant Pathology* 7: 35-47. 1975.
- Melo, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds.) *Controle Biológico*. Jaguariúna. Embrapa. 1998. pp. 17-68.
- Monz, C.A.; Hunt, H.W.; Reeve, F.B. & Elliott, E.T. The response of mycorrhizae colonization to elevated CO<sub>2</sub> and climate change in *Pascopyrum smithii* and *Boteloua gracilis*. *Plant and Soil* 165: 75-80. 1994.
- Morandi, M.A.B.; Mafia, L.A. & Sutton, J.C. Development of *Clonostachys rosea* and interations with *Botrytis cinerea* in rose leaves and residues. *Phytoparasitica* 29: 103-113. 2001.
- National Research Council. *Alternative Agriculture*. Washington, D.C. National Academy Press. 1989.
- Nosengo, N. Fertilized to death. *Nature* 425: 894-895. 2003.
- Osono, T. & Takeda, H. Microfungi associated with *Abies* needles and *Betula* leaf litter in a subalpine coniferous forest. *Canadian Journal of Microbiology* 53: 1-7. 2007.
- Pascholati, S.F. & Leite, B. Mecanismos bioquímicos de resistência às doenças. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 2: 1-51. 1994.
- Percy, K.E.; Awmack, C.S.; Lindroth, R.L.; Kubiske, M.E.; Kopper, B.J.; Isebrands, J.G.; Pregitzer, K.S.; Hendrey, G.R.; Dickson, R.E.; Zak, D.R.; Oksanen, E.; Sober, J.; Harrington, R. & Karnosky, D.F. Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO<sub>2</sub> and O<sub>3</sub>. *Nature* 420: 403-407. 2002.
- Pritchard, S.G. & Amthor, J.S. *Crops and Environmental Change*. Binghamton. Food Products Press. 2005.
- Reich, P. B.; Hungate, B. A. & Luo, Y. Q. Carbon-nitrogen interactions in terrestrial ecosystems in response to rising atmospheric carbon dioxide. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 37: 611-636. 2006.
- Rezáková, V.; Blum, H.; Hrselová, H.; Gamper, H. & Gryndler, M. Saprobic microfungi under *Lolium perenne* and *Trifolium repens* at different fertilization intensities and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration. *Global Change Biology* 11: 224-230. 2005.
- Ribeiro, I.J.A.; Mônico L.C.; Tassel Filho, O. & Sugimori, M.H. Efeito de alta temperatura no desenvolvimento de *Hemileia vastatrix* em cafeeiro. *Bragantia* 37: 11-16. 1978.



- Rillig, M.C. & Allen, M.F. Arbuscular mycorrhizae of *Gutierrezia sarothrae* and elevated carbon dioxide: evidence for shifts in C allocation to and within the mycobiont. *Soil Biology & Biochemistry* 30: 2001-2008. 1998.
- Rodrigues Junior, C.J. Coffee rust races and resistance. In: Fulton, R.H. (Ed.) *Coffee rust in the Americas*. St Paul. APS. 1984. pp. 41-58.
- Rodríguez-Kabana, R. & Calvet, C. Capacidad del suelo para controlar enfermedades de origen edáfica. *Fitopatologia Brasileira* 19: 129-138. 1994.
- Rønn, R.; Ekelund, F. & Christensen, S. Effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on protozoan abundance in soil planted with wheat and on decomposition of wheat roots. *Plant and Soil* 251: 13-21. 2003.
- Røon, R.; Gavito, M.; Larsen, J.; Jakobsen, I. Frederiksen, H. & Cristensen, S. Response of free-living protozoa soil and microorganisms to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and presence of mycorrhiza. *Soil Biology & Biochemistry* 34: 923-932. 2002.
- Saunders, P.J.W. Modification of the leaf surface and its environment by pollution. In: Preece, T.F. & Dickinson, C.H. (Eds.) *Ecology of leaf surface micro-organisms*. New York. Academic Press. 1971. pp. 81-89.
- Siegenthaler, U.; Stocker, T.F.; Monnin, E.; Luthi, D.; Schwander, J.; Stauffer, B.; Raynaud, D.; Barnola, J.M.; Fischer, H.; Masson-Delmotte, V.; Jouzel, J. Stable carbon cycle-climate relationship during the late pleistocene. *Science* 310: 1313-1317. 2005.
- Siqueira, O.J.W.; Salles, L.A.B. & Fernandes, J.M. Efeitos potenciais das mudanças climáticas na agricultura brasileira e estratégias adaptativas para algumas culturas. In: Lima, M.A.; Cabral, O.M.R. & Miguez, J.D.G. (Eds.) *Mudanças climáticas globais e a agropecuária brasileira*. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2001. pp. 33-63.
- Skidmore, A.M. Interactions in relation to biological control of plant pathogens. In: Dickinson, C.H. & Preece, T.F. (Eds.) *Microbiology of aerial plant surfaces*. New York. Academic Press. 1976. pp. 507-528.
- Smith, W.H. Air pollution - effects on the structure and functions of plant-surface microbial-ecosystems. In: Dickinson, C.H. & Preece, T.F. (Eds.) *Microbiology of aerial plant surfaces*. New York. Academic Press. 1976. pp. 75-105.
- Smith, W.H. *Air Pollution and Forests: Interactions between air contaminants and forest ecosystems*. New York. Springer-Verlag. 1981.
- Spahni, R.; Chappellaz, J.; Stocker, T.J.; Louergue, L.; Hausammann, G.; Kawamura, K.; Fluckiger, J.; Schwander, J.; Raynaud, D.; Masson-Delmotte, V. & Jouzel, J. Atmospheric methane and nitrous oxide of the late pleistocene from Antarctic ice cores. *Science* 310: 1317-1321. 2005.
- Stacey, D.A. Climate and biological control in organic crops. *International Journal of Pest Management* 49: 205-214. 2003.
- Staddon, P.L.; Heinmeyer, A. & Fitter, A.H. Mycorrhizas and global environmental change: research at different scales. *Plant and Soil* 244: 252-261. 2002.
- Stangarlin, J.R. & Pascholati, S.F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. *Summa Phytopathologica* 20: 16-21. 1994.
- Sutton, J.C.; Li, D.; Peng, G.; Yu, H.; Zhang, P. & Valdebenito-Sanhueza, R.M. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-328. 1997.
- Valarini, G.; Melo, I. S. & Valarini, M. J. Utilização de leveduras habitantes de superfície de folha como bioindicador de poluição do ar. Anais, 2º. Simpósio Mineiro de Engenharia Ambiental, Viçosa, MG. 2006. 4p. CD ROM.
- Verhoef, H. Soil biota and activity. In: Doelman, P. & Eijsackers, H. (Eds.) *Vital soil: Function, value and properties*. Amsterdam. Elsevier. 2004. pp. 99-125.
- Ward, N.L. & Masters, G.J. Linking climate change and species invasion: an illustration using insect herbivores. *Global Change Biology* 13: 1605-1615. 2007.
- Warwick, D.R.N. Colonização de estromas de *Sphaerodothis acrocomiae* agente causal da lixa grande do coqueiro por *Acremonium persicinum*. *Fitopatologia Brasileira* 26: 220. 2001. (Resumo).
- Zambolim, L. Potencial de fungos micorrízicos vesículo-arbuscular no controle de fitopatógenos e implicações com a nutrição fosfatada. In: Bettiol, W. (Ed.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. Embrapa-CNPMA. 1991. pp. 87-120.

## Capítulo 4

# **Fish Emulsion and Liquid Swine Manure: Model Systems for Development of Organic Amendments as Fertilizers with Disease Suppressive Properties**

George Lazarovits<sup>1</sup>, Pervaiz A. Abbasi<sup>1</sup>, Kenneth L. Conn<sup>1</sup>, Janet E. Hill<sup>2</sup> & Sean M. Hemmingsen<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Agriculture and Agri-Food Canada, Southern Crop Protection and Food Research Centre, 1391 Sandford Street, London, ON N5V 4T3, Canada. e-mail: lazarovitsg@agr.gc.ca; Fax: 1-519-457-3997.* <sup>2</sup>*Department of Veterinary Microbiology, University of Saskatchewan, 52 Campus Drive, Saskatoon, SK S7N 5B4, Canada.* <sup>3</sup>*National Research Council Plant Biotechnology Institute, Saskatoon, SK S7N 0W9, Canada*

## **Introduction**

Organic materials derived from the processing of animal and vegetable food products such as blood meal, bone meal, fish meal, soya meal, cotton seed meal, and manures collected from animal production facilities have been used for centuries by gardeners and farmers as soil supplements (fertilizers) (Waksman & Starkey, 1931). Despite documented evidence that many of these products also exhibit plant disease control effects (Huber & Watson, 1970; Trankner 1992), such impacts have been largely ignored in the age of agro-chemicals. Wilhelm (1951) tested about two dozen chemicals and organic amendments for control of *Verticillium* infection of tomatoes but found only two products, blood meal and fish meal, incorporated into soil at 1% (*m/m* soil), provided near 100% disease control. Similar reports of effective disease control by such materials were subsequently reported but their mode of action remained unexamined and unexplained.

In most regions of the world soilborne plant diseases and plant-parasitic nematodes continue to be major factors in crop losses. The primary means for controlling soilborne plant pathogens and pests remains the application of biocidal fumigants that kill the vast majority of organisms living in soil. However, as we unravel the rhizosphere ecology and come to identify the multiple benefits some organisms can confer to crop production and as the demand by society to find reduced-risk and non-chemical options of managing soilborne diseases increase, the use of organic amendments is again gaining attention.

Our initial objective for the use of organic amendments was as delivery agents for microorganisms with known biological control activity. There was also hope that these materials would stimulate the activity of not only biocontrol agents being applied but also those of the resident microorganisms. However, we came to the realization quite early that many such products are effective in suppressing disease without the need for additional microorganisms. The mechanism by which they do this we felt was worth further investigation. Summaries of this work have been published elsewhere (Bailey & Lazarovits, 2003; Lazarovits, 2001, 2004; Lazarovits *et al.*, 2001, 2005). In this chapter we will focus on the two most effective materials thus far tested, namely fish emulsion (FE) and liquid swine manure (LSM). Both these products have unique activities and by developing an understanding of their mode of action we expect to realize a much greater potential for their use as fertilizers and plant protection products.

The use of fish by-products for fertilization of crops has a long history (Ceci, 1975). Fish meal, the dried protein obtained from processed fish, has been used as a soil amendment with great success in vegetable production systems (Blatt & McRae, 1998; Gagnon & Berrouard, 1994) and was observed to reduce the populations of plant-parasitic nematodes (Akhtar & Mahmood, 1995). FE, the concentrated fraction of the soup left after processing fish into fish meal, is applied to crops in a diluted form (1:100-1000) primarily as a foliar fertilizer (Aung *et al.*, 1984). However, some growers have reported plant health benefits and increased growth responses after application of FE but most manufacturers do not have a clear idea as to why growers are using their FE products.

Plant health benefits derived from using LSM are even less well documented or understood than for FE. Our initial intent when we applied LSM to a potato field was to determine if LSM increased the incidence of common scab, as the vast majority of literature indicated that manure applications would have this effect. However, we discovered that a single application of LSM to a potato field having a soil pH of 5 resulted in a significant reduction of common scab [*Streptomyces scabies* (Thaxter) Lambert & Loria = *Streptomyces. scabiei* (Trüper & de Clari, 1997)] and verticillium wilt [*Verticillium dahliae* Kleb.] for up to 3 years (Conn & Lazarovits, 1999). Disease reduction with the same LSM, however, was not observed at a second site where the soil pH was neutral (Conn & Lazarovits, 1999). At that time we were not able to explain this anomaly. To understand what mechanisms may be acting we brought the soil and the LSM back to the laboratory and studied the effects using microcosm systems. With both LSM and FE, small scale laboratory model systems proved to be a critical tool for identifying how these materials impacted plant pathogen populations and hence disease severity.

## Disease Suppressiveness of Fish Emulsion

**In Substrate.** Our work with FE was done using samples made from menhaden fish (*Brevoortia tyrannus* (Latrobe)) by Omega Protein, Houston, TX, USA. The nutrient content of FE is detailed in Table 1. In the absence of pathogens, FE applied at rates ranging from 1-4% (*m/m* mix) to a peat-based substrate promoted the growth of radish, cucumber, and tobacco seedlings to the same weights and heights as observed with seedlings fertilized with equivalent amounts of inorganic fertilizer (NPK levels calculated only) (Abbasi *et al.*, 2004). The 2-4% FE rate was optimal and provided sufficient nutrition for plants for up to 6-8 weeks of growth. For plants growing in soil, 1% FE was often sufficient and rates higher than this were sometimes phytotoxic in sandy loam soils when not added well before planting of seeds.

**Table 1.** Nutrient analysis of fish emulsion (FE).

FE batch	N <sup>a</sup>	NH <sub>4</sub> -N	P <sup>b</sup>	K <sup>c</sup>	Na	Ca	Mg	S (ppm)	OM	C:N ratio	Dry matter
				(%)					(%)		(%)
2001	4.3	0.6	1.5	1.9	1.2	0.1	0.1	12700	83	6:1	47.7
2003	6.0	0.4	1.8	2.2	1.4	0.2	0.1	19900	79	4:1	51.6

Note: Density of FE is 1.2 and pH is 2.8. Analyses were performed by A&L Canada Laboratories East Inc., London, ON, Canada. <sup>a</sup> Total nitrogen; <sup>b</sup> Phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; <sup>c</sup> Potassium as K<sub>2</sub>O; Organic matter (OM) on a dry matter basis.

To test if FE had any disease suppressing properties, we used the radish-*Rhizoctonia solani* and cucumber-*Pythium aphanidermatum* model systems in an artificially infested peat-based mix grown and growth under controlled environmental room conditions (Abbasi *et al.*, 2004). FE (1-4% *m/m* mix), or the equivalent inorganic NPK fertilizer, was incorporated into pathogen-infested substrate and the mixtures were incubated for 1, 7, 14, and 28 days prior to planting radish or cucumber seeds. Plants were rated 14 days later for incidence and severity of damping-off. Seedlings produced in the peat-based mix incubated for only 1 day with FE were often as highly diseased as the control treatments, although occasionally significant disease reduction was seen (Abbasi *et al.*, 2004). In peat-based mix treated with 4% FE 7 days prior to seeding, 70-80% of the seedlings remained disease-free and when treated 28 days prior to seeding even the 1% rate of FE provided similarly high levels of protection. The equivalent levels of inorganic NPK treatment provided no disease control (Abbasi *et al.*, 2004).

**In Soil.** Incorporation of 0.5% (*m/m* soil) FE into a *Rhizoctonia solani*-infested sandy loam soil 5 days prior to planting radish provided effective control of damping-off disease (Abbasi *et al.*, 2004). In muck soil naturally infested with damping-off pathogens, FE (2 and 4% *m/m* soil) also effectively and consistently suppressed damping-off of cucumber seedlings. Significant increases in soil bacteria and fungi were seen after addition of FE and suggest that FE may enhance a biological climate that is suppressive to plant pathogens. Our attempts to define what changes in microbial communities occurred following FE additions in these muck soils is describe in a later section.

FE when applied as a pre-plant soil amendment provided control of common scab of potato (Abbasi *et al.*, 2006). We tested FE in 11 soils of different characteristics (pH 5.2-7.2, organic matter 1-3.7) collected from commercial potato fields from four provinces (Abbasi *et al.*, 2006). Under greenhouse conditions, FE (0.5 and 1% *m/m* soil) added to some of these soils protected eggplants from verticillium wilt and increased (1% only) fresh and dry plant biomass. In micro-plots, 1% FE significantly reduced common scab severity in seven soils with low to medium scab disease pressure and increased total tuber yield by 41-170% in nine soils compared to the controls. FE also reduced the petiole infection by *Verticillium dahliae* in some soils but only significantly in one soil. In field trials at two sites located in grower fields, 1% FE (20,000 l/ha) significantly reduced scab severity, increased the percentage of disease-free tubers by 132-366%, and increased marketable tuber yield by two-fold compared to the control at both sites. The rates required, however, were much too costly for commercial use.

**As a Foliar Spray.** Foliar sprays of a diluted solution of FE (0.5% v/v water) controlled bacterial spot of tomato and pepper (Abbasi *et al.*, 2003). FE applied as a foliar spray reduced the incidence and severity of bacterial spot of tomato and pepper under both greenhouse and field conditions (Abbasi *et al.*, 2003). The disease incidence on the fruit of these plants was reduced but the effect was not always statistically significant. However, the number of lesions per pepper fruit was significantly less with the FE foliar sprays. FE increased healthy and total fruit yield of tomatoes and healthy fruit yield of peppers in some but not all years. These results suggest that disease management programs for bacterial spot may be enhanced by including foliar sprays of FE.

## Disease Suppressiveness of Liquid Swine Manure

Incorporation of liquid swine manure (LSM) at 55,000 l/ha as a pre-plant soil amendment was effective in reducing verticillium wilt, common scab, and populations of plant-parasitic nematodes in the year of application at two commercial potato field locations in Ontario, Canada (Conn & Lazarovits, 1999). Scab severity remained lower than the control treatment for 3 years at one site without further application of LSM. LSM had no effect on disease severity at a third field in the same area the next year. Thus, the impact of LSM on disease severity was different between potato fields. To determine the reason for the variable results, LSM and soil were brought back to the laboratory to conduct experiments using microcosm systems. We found that soil pH was the most important soil factor determining whether LSM could kill *Verticillium dahliae* microsclerotia within one day of application to soil (Conn & Lazarovits, 2000). LSM was toxic to *Verticillium dahliae* in soils with pH below 6 but not toxic in neutral pH soils. The nature of the toxic compounds is discussed later in this chapter. This information about the importance of soil pH provided an explanation for the different results in the field experiments discussed above. The field where LSM worked best had a soil pH of 5 while the field where LSM was not effective had a neutral soil pH. Soil moisture was also found to be a

factor such that the dryer a soil, the more toxic LSM was to *Verticillium dahliae* (Conn & Lazarovits, 2000). This was strictly due to dilution of the effective compounds as the soil moisture increased.

LSM as a soil amendment has been reported to reduce other plant pathogens as well. Gorissen *et al.* (2004) reported that in microcosms and field plot studies, the addition of LSM to soil (17 t/ha) lowered populations of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of wilting disease of potato, and reduced the number of infected plants. Addition of LSM to soil in a pot study reduced the viability of eggs of the soybean cyst nematode (Xiao *et al.*, 2007).

## Mechanisms of Disease Reduction

The mechanism(s) of disease reduction associated with organic amendments have been ignored for the most part. However, in order to optimize efficacy such information is vital. Many mechanisms have been proposed for organic amendments including stimulation of resident microorganisms with biocontrol activity (Akhtar & Malik, 2000; Mazzola, 2004); induction of systemic resistance in plants (Hoitink & Boehm, 1999); generation of toxic chemicals such as ammonia, nitrous acid, hydrogen cyanide, formaldehyde, ethylene, acetone, etc. (Linderman & Gilbert, 1975; Pavlica *et al.*, 1978; Tenuta & Lazarovits, 2002a; Voisard *et al.*, 1989); and the presence of toxic substances in the amendments such as volatile fatty acids (VFAs) (Tenuta *et al.*, 2002). It is likely that disease reduction by FE and LSM have been due to more than one mechanism but which ones play a dominant role is likely to be soil or substrate specific. The rates of amendment used may also have an effect on the prevailing mechanism.

## Volatile Fatty Acids

Death of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in the presence of LSM occurs within 1-2 days after incorporation into acid soil, but it has no effect in a neutral pH soil (Conn & Lazarovits, 2000). Using solution assays, the toxic components were demonstrated to be volatile fatty acids (VFAs) present in the LSM (Tenuta *et al.*, 2002). The amounts and types of VFAs found in LSM are shown in Table 2. Acetic, propionic, and isobutyric acids are the major VFAs while *n*-butyric, *n*-valeric, isovaleric, and *n*-caproic acids are present in lesser amounts. Only the non-ionized forms of the VFAs are toxic (e.g. acetic acid). At pH ranges of neutral or higher VFAs are ionized and exist as non toxic salts (e.g. sodium acetate). Thus, LSM would only be expected to reduce pathogen survival in acidic soils (Tenuta *et al.*, 2002). VFAs present in LSM by themselves were shown to be toxic to *Verticillium dahliae* microsclerotia in acid soils within one day after application (Conn *et al.*, 2005). A concentration of about 3 mM (*m/m* soil water) of the nonionized form of VFAs from LSM in soil is needed to kill *Verticillium dahliae* (Conn *et al.*, 2005). The VFAs however, are rapidly degraded in soil and can be detected only for a few days after addition.

FE also contains VFAs with glycolic and acetic acid being the major VFAs (Table 2). VFA toxicity is likely to be one of the mechanisms of disease reduction by fish emulsion in low pH soils (Abbasi *et al.*, 2006). FE contains formic acid, rarely found in LSM, and we have shown that formic acid is seven times more toxic to *Verticillium dahliae* compared to acetic acid (Tenuta *et al.*, 2002).

Not all LSMs have sufficient quantities of VFAs to be useful as a disease control product. We had observed that about 60% of LSMs tested from different sources in southwestern Ontario had sufficient VFAs to be useful (Conn *et al.*, 2005). To determine what factors influenced the VFA content of LSMs, a 3-year survey of manure from 15 swine farms in southwestern Ontario was conducted (Conn *et al.*, 2007). We found that LSM from finishing pig operations tended to have 4.6-times higher concentration of VFAs than those from sow operations (Table 2). This was due to a larger density of pigs in finishing compared with sow operations, less manure storage capacity per pig for finishing compared with sow operations, and more wash water being used for sow operations. Thus, only manure from finishing pig operations has sufficient concentrations of VFAs to be potentially useful as a disease control product. The use of materials of unknown composition has no doubt been one of the major sources for variability in disease control efficacy.

**Table 2.** Concentration of volatile fatty acids (VFAs) in fish emulsion (FE) and liquid swine manure (LSM).

	VFA concentration (mmol/L)									
	Glycolic	Formic	Acetic	iso-Propionic	n-Butyric	iso-Butyric	n-Valeric	Valeric	Caproic	Total
FE	200	30	110	25	25	1	2	0	0	393
LSM <sup>1</sup>	0	0	25	7.1	0.9	- <sup>3</sup>	1.0	0.4	0.7	36
LSM <sup>2</sup>	0	0	94	44	7.6	- <sup>3</sup>	8.3	4.7	5.9	166

Note: LSM and FE samples were diluted 10 and 100 times before analyses and particulates were removed by centrifugation for 10 min at 10,600 g. <sup>1</sup>Average VFA concentration of 21 sow manure samples (adapted from Conn *et al.*, 2007). <sup>2</sup>Average VFA concentration of 16 finishing pig manure samples (adapted from Conn *et al.*, 2007). <sup>3</sup>n-Butyric acid could not be determined for LSM because of interference from an unknown peak (Abbasi *et al.*, 2009).

## Manipulation of Soil pH to Take Advantage of VFAs

Since LSM containing VFAs is toxic to plant pathogenic microorganisms only in soils with a pH below 6, we investigated if it would be possible to expand its use by temporarily acidifying soils by addition of an acid. We tested this approach in a number of micro-plot and field trials using sulphuric acid as a means to lower soil pH (Conn & Lazarovits, 2007). Addition of acidified LSM to commercial potato soils with a high pH soil reduced potato scab disease to near zero. Reducing soil pH with sulfuric acid alone can result in significant reductions in potato scab if the soil pH is made permanently acid for the growing season. Sulfuric acid alone had no

effect on verticillium wilt. There is no long-term disease control by sulfuric acid alone if the soil pH returns to control levels. Tuber yield was doubled after addition of acidified LSM compared to the control treatment. Tuber yield was either not affected or reduced after addition of sulfuric acid alone. Application of acidified LSM in the year prior to a potato crop was just as effective at reducing disease as when applied in the year of the crop. Application of LSM in a rotation year will be safer with respect to potential contamination of the potatoes with potential human pathogens from the manure. Application of acidified LSM 2 years in a row reduced disease and increased tuber yield more than a single application. For field experiments the sulfuric acid and LSM were applied using a manure spreader showing that a farmer could use this technology.

Whether use of acidified LSM is economical for control of soilborne diseases depends upon such things as: (1) The VFA content of the manure; (2) The pH and buffering capacity of the soil which affects how much sulfuric acid is needed to lower the pH. It may not be economical to acidify soils with pH above 6.5; (3) How far the soil pH is to be lowered. Reduction to pH 5 takes less acid than reduction to pH 4.5; (4) How far is scab severity decreased and yield increased. The scab severity and yield combine to determine the marketable yield; (5) How long the disease control persists for. If a single application of acidified LSM provides reduced disease for more than one potato crop, the treatment becomes more economical; and (6) Cost of sulfuric acid.

It may be possible to use VFAs alone as a disease control products. Browning *et al.* (2006) showed that butyric acid could be used for control of soilborne fungal pathogens and nematodes affecting strawberries. We examined the use of formic acid soil treatment for control of common scab of potato (Conn & Lazarovits, unpublished results). We chose to test formic acid instead of the major VFA (acetic acid) in LSM because it is cheaper and as mentioned earlier is seven times more toxic than acetic acid (Tenuta *et al.*, 2002). Common scab severity was reduced when formic acid was added to acid soils or formic plus sulfuric acid added to neutral pH soils. However, disease severity returned to control levels when the soil pH returned to control levels. Thus, it does not appear that VFAs alone can provide longer-term disease control similar to that brought about by LSM (Conn & Lazarovits, 1999). This may in part be due to the fact that LSM application results in a dramatic increase in soil microorganism populations (Conn & Lazarovits, 1999) while VFAs alone do not. Thus, in addition to reducing pathogen populations by VFA toxicity, LSM may be keeping pathogens suppressed by stimulation of biocontrol microorganisms in soil. Stimulation of biocontrol microorganisms is discussed later in this chapter.

## Ammonia

In addition to VFAs, LSM contains ammonia (Conn *et al.*, 2005, 2007). Ammonia at pH levels below 7 exists as ammonium, which has no known toxic properties. However, at pH levels above 7, ammonium is converted to ammonia and reaches the 50% equilibrium (pKa) at pH 9.3 at 24 °C. Ammonia is very toxic (Warren, 1962) and accumulates in soil following addition of various organic amendments.



It has been shown to be toxic to a spectrum of fungal pathogens including *Verticillium dahliae* (Tenuta & Lazarovits, 2002a); *Fusarium* (Loffler & Schippers, 1984; Zakaria & Lockwood, 1980; Zakaria *et al.*, 1980), *Sclerotinia* (Henis & Chet, 1967; Punja & Grogan, 1982), *Macrophomina* (Chun & Lockwood, 1985; Filho & Dhingra, 1980), *Phymatotrichum* (Rush & Lyda, 1982), *Pythium* and *Phytophthora* (Gamliel & Stapleton, 1993a,b; Gilpatrick, 1969; Tsao & Oster, 1981) and various plant parasitic nematode species (Alam, 1992; Kaplan & Noe, 1993). Several biological control agents including *Enterobacter cloacae* (Howell *et al.*, 1988) and *Bacillus cereus* (Oka *et al.*, 1993) have been implicated to act by production of ammonia. Tenuta & Lazarovits (2002b) showed that the primary factors determining the potential for ammonia accumulation in a soil are organic matter content and buffering capacity.

We investigated whether LSM could be toxic to *Verticillium dahliae* in high pH soils (Conn *et al.*, 2005). Using microcosm systems, LSM was added to two soils from Delray Beach, FL, USA of pH 7.9 and 8.3. Within 1 day of application the soil pH rose to almost 9 for both soils. After a 1 week exposure, germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia were shown to be reduced by 80% compared to the control treatment. Thus, LSM could be used as a disease control product for high pH soils as well as low pH soils.

## Nitrous Acid

We had noticed that sometimes there was a decline in *Verticillium dahliae* microsclerotia viability 3-6 weeks after addition of LSM to some soils which coincided with a decrease in soil pH below 5 (Conn *et al.*, 2005). Since the toxicity occurred after several weeks, it could not be due to VFAs. Ammonia could not be responsible either because at low pH it would be in the form of ammonium, which is not toxic. A more likely candidate would be the presence of nitrous acid which is formed after ammonium is converted to nitrite and soil pH decreases to below pH 5.0. At this pH of lower, some of the nitrite is in the form of nitrous acid ( $\text{HNO}_2$ ,  $\text{pK}_a = 3.3$ ) and  $\text{HNO}_2$  is 300-500 times more toxic to microsclerotia than  $\text{NH}_3$  (Tenuta & Lazarovits, 2002a). It is also toxic to a broad spectrum of plant pathogens and weed seeds. The formation of  $\text{HNO}_2$  is most influenced by soil buffering capacity as the pH is not readily altered in buffered soils (Tenuta & Lazarovits, 2004). Thus, in some low pH soils, LSM can reduce pathogen populations by VFA and/or  $\text{HNO}_2$  toxicity.

## Biological Control

One of the key long-term benefits of incorporating organic amendments into soil is the generation of natural disease suppressiveness. Agricultural soils naturally suppressive to soilborne plant pathogens and nematode pests have been found worldwide (Weller, 1998; Weller *et al.*, 2002). The basis of suppressive soils in most

cases has been attributed to biological activity (Weller *et al.*, 2002), but soil chemical and physical factors may also play a role. Both FE and LSM stimulate the microbial activity in amended soils or substrates, most specifically those of *Trichoderma* spp. often associated with disease suppressive composts (Abbasi *et al.*, 2004; Conn & Lazarovits, 1999). In peat-based mix, FE sometimes did not appear to have any direct toxicity to damping-off pathogens but appeared to act by creating a biological climate that was suppressive to disease initiation (Abbasi *et al.*, 2004). The delayed improvement of disease control with time corresponded with increased microbial activity in the amended mix. In peat mixes where we observed the best control the populations of culturable fungi and bacteria had increased significantly by 7 days after incorporation of FE to peat-based mix. This incubation time also corresponded to the initiation of the disease suppression by the amended peat-based mix. FE has also been used as a nutrient base for plant growth promoting rhizobacteria to enhance radish growth (El-Tarabily *et al.*, 2003). Mazzola found that the suppression of specific apple root pathogens by *Brassica* seed meal amendments was likely through biological control through enrichment of fluorescent *Pseudomonads* and *Streptomyces* species (Mazzola, 2004; Mazzola *et al.*, 2001, 2007). He did not report if chemical alterations also occurred in these soils but it would be highly likely that such compounds were also involved.

Although very significant increases in microorganism populations as a result of FE amendment were observed, it is not possible to readily identify who may be the key players. As a first step to developing disease suppressive conditions it is essential that we identify the microbial communities and the microbe-plant-pathogen interactions that regulate disease suppression. Such information would provide us directions as to how to induce or enhance suppressive microflora in the rhizosphere. Methods for characterizing microbial communities of healthy and infected roots and soils are now available with the advances and reduced costs of molecular technologies (Borneman *et al.*, 1996; Bowman & Saylor, 1996; Ogram & Sharma, 2002). These methods are proving to be valuable for defining the key organisms or groups of organisms responsible for disease suppression as well as for monitoring the spread of introduced biological control agents and the impacts of management practices on natural microbial populations.

Analyses of ribosomal DNA (rDNA), generally 16S rDNA, by PCR amplification followed by denaturing or temperature-gradient gel electrophoresis (D/TGGE) or by single-strand conformation polymorphism (SSCP) (Schwieger & Tebbe, 2000) have been widely applied for characterization of microbial community structures. By the use of group-specific primers, temporal and spatial changes in microbial populations with known functions can be monitored, which makes it possible to evaluate long-term effects of bacterial inoculants on the stability and functioning of bacterial communities (Haruta *et al.*, 2002; Sigler *et al.*, 2001). Alternatively, terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis by fluorescent labeling of terminal restriction fragments provides a particularly powerful means to study microbial diversity at various taxonomic levels. These approaches allow for the simultaneous analysis of a large number of samples and have been extensively used for comparing the structures of complex microbial communities and monitoring whole communities, focusing on phylotypes for which the occurrence and/or the relative frequency are affected by any environmental change.

## Cpn60-based Technology

Chaperonin proteins are molecular chaperones that are essential for the folding and assembly of proteins in all bacteria and in the plastids and mitochondria of eukaryotes (Hemmingsen *et al.*, 1988; Saibil & Ranson, 2002). In most bacteria a single copy gene, *cpn60*, encodes this protein and it is an informative target for microbial species identification and for phylogenetics. Hill *et al.* (2002) have described a robust, generic, molecular method for identifying microorganisms, based on amplification of a portion of the *cpn60* gene, the “universal target” (UT), using universal, degenerate PCR primers (Goh *et al.*, 2000). This method has demonstrated advantages over 16S *rRNA*-based methods. First, the protein-encoding *cpn60* gene is richer in phylogenetically informative sequence variation than is the structural RNA-encoding 16S *rRNA* gene. While 16S *rRNA* gene sequences are often identical between closely related organisms (Chatellier *et al.*, 1998), *cpn60* UT sequences usually discriminate different species within a genus, and sometimes serotypes or subspecies within a species (Brousseau *et al.*, 2001). Second, as a single-copy gene, *cpn60* lacks the potential for some sequencing artefacts that are encountered with the multiple-copy 16S *rRNA* gene. This characteristic is also advantageous for quantitative PCR assays. Last, the 549-567 bp *cpn60* UT can be sequenced easily with a single reaction, whereas the full length (~1.5 kbp) sequence of the 16S *rRNA* gene is often required to distinguish two given species, if it is possible at all. Thus, high throughput sequencing of large libraries of cloned *cpn60* gene UT regions is relatively economical and this approach has been developed for identifying and enumerating members of complex microbial communities (Hill *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2005 ab; Hill *et al.*, 2006).

Any sequence-based approach to microbial species identification however, is dependent on the availability of a sufficient collection of reference sequence data. The chaperonin sequence database, cpnDB (<http://cpndb.cbr.nrc.ca>), contains ~5600 sequences, including ~1,600 reference sequences from named organisms (prokaryotic and eukaryotic). cpnDB also includes sequences derived from previous microbial population studies and clinical and field isolates generated by the investigators' prior studies. cpnDB has been essential for creating phylogenetic context for cloned sequences derived from population studies of complex microbial communities (Hill *et al.*, 2002) and for the identifying clinical isolates (Goh *et al.*, 2000).

### **Molecular Determination of Microbial Changes in Muck Soil Amended with FE Using the *cpn60* Target**

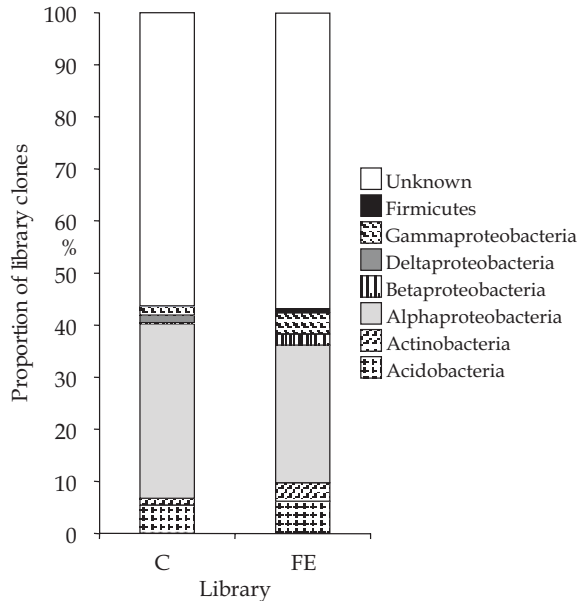
We set out to examine if the *cpn60* technology can be used to determine what microbial changes occur as a result of FE treatment of a muck soil heavily infested with plant pathogens (Abbasi *et al.*, 2004). Total DNA was extracted from 200 mg aliquots of soil samples (control and 1% FE at 14 days incubation) and the extracted

DNA was used as template in PCR reactions for *cpn60* library construction. Forward and reverse *cpn60* universal primer mixtures were applied to amplify the region of the *cpn60* gene corresponding to nucleotides 274-828 of the *Escherichia coli cpn60* sequence (Hill *et al.*, 2006); the forward primer mixture was a 1:3 molar ratio of primers H279 (5'-GAI III GCI GGI GAY GGI ACI ACI AC-3') and H1612 (5'-GAI III GCI GGY GAC GGY ACS ACS AC-3') and the reverse primer mixture was a 1:3 molar ratio of primers H280 (5'-YKI YKI TCI CCR AAI CCI GGI GCY TT-3') and H1613 (5'-CGR CGR TCR CCG AAG CCS GGI GCC TT-3'). PCR products generated from the control and FE templates were used to generate clone libraries that were analysed by high throughput DNA sequencing.

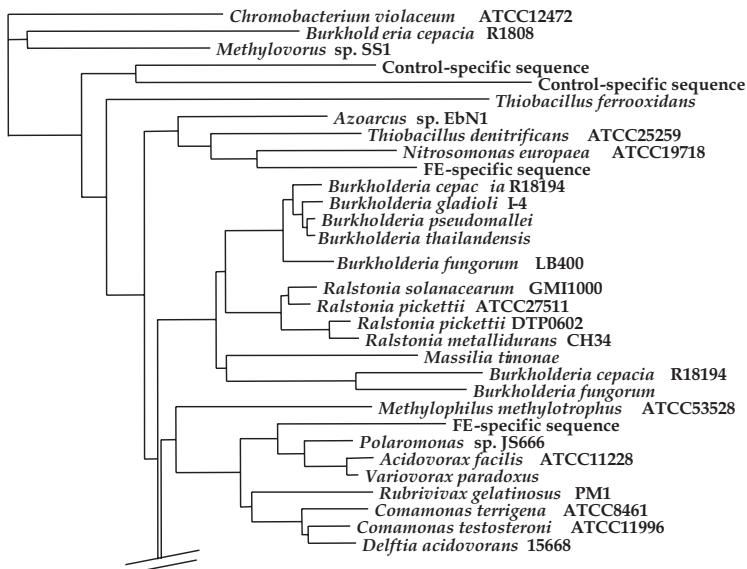
In total, 1990 clones were sequenced (1038 from the control library and 952 from the FE library) and an intra-library comparison of sequences indicated the presence of 472 different sequences in the control library (ranging in frequency from 1 to 133) and 445 different sequences in the FE library (ranging in frequency from 1 to 68). To identify the sequences in the muck soil *cpn60* libraries they were compared to cpnDB, the *cpn60* reference sequence database, using FASTA. Sequence identities ranged from 60-100% with an average identity of 76%. Only 34% of the sequences in the control library (representing 44% of the clones in that library) were at least 79% identical to any reference *cpn60* sequence. For the 1% FE library, 37% of the sequences (representing 43% of the clones) were within the 79% confidence limit. We based our 79% confidence limit on an assessment of the FASTA results and phylogenetic analysis of sequences both above and below this cutoff. Sequences with at least 79% identity to reference sequences could be robustly placed into families through bootstrap and phylogenetic analysis, whereas sequences less similar to reference sequences could not be reliably classified. Distribution of G+C content within identified and unidentified sequences were similar, suggesting that unidentified sequences were not limited one or a few particular taxa.

The composition of the control and 1% FE libraries is illustrated in Figure 1. In each case, the Alphaproteobacteria were dominant among the identified sequences. The FE library had a relatively lower proportions of Alphaproteobacteria and Deltaproteobacteria and correspondingly higher proportions of Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, and Actinobacteria.

The library sequences in context of the Beta Proteobacteria are illustrated in Figure 2. The libraries proved to be incredibly diverse and less than half of the sequences recovered could be identified with any confidence. However, differences in population composition between control and FE soils were found but to what extent we can rely on the validity of the differences will require significantly more experimentation. The 79% DNA identity cutoff for identification is conservative given that typical intra-genus pairwise identities for bacterial *cpn60* sequence can be substantially lower (for example, as low as 71% in the genus *Campylobacter* (Hill *et al.*, 2006). The greatest hindrance for identification of muck soil library sequences was the lack of depth of reference sequences in relevant taxa. Soil contains a lot of uncultured organisms, such as the Acidobacteria, for which little sequence data is available. A lack of phylogenetic context and few sequence reference points makes identification difficult. We are encouraging all soil microbiologist to get involved in the cpnDB project and publish *cpn60* gene sequences of well characterized isolates to increase the quantity and quality of public reference sequence data.



**Figure 1.** Taxonomic composition of muck soil *cpr60* libraries based on comparison to reference sequence data in the cpnDB database (CN = control, 1038 clones; FE = 1% fish emulsion, 952 clones). Only clones containing sequences with at least 79% nucleotide sequence identity to a reference sequence are assigned to a family.



**Figure 2.** Putting library sequences in context – the Beta Proteobacteria

**Table 3.** PCR primer sets for SYBR green quantitative real-time PCR of muck soil community targets

Target name	Primer	Primer sequence (5'-3')	Annealing temp. (C)	PCR product size (bp)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	H1633	GACCATCGCTGTTGTTGCC	63	207
	H1634	CCTTCTACAACCGACAGTTCGTT		
Muck soil Group A	H1637	CGCCGAACTGAAGAATCTG	60	100
3 sequences with similarity to Gammaproteobacteria	H1638	CAGGTCGCCGATGTTGGTA		
Muck soil Group B	H1639	TGTTACCACAACCGTTGAGGAG	60	118
2 sequences with similarity to Betaproteobacteria	H1640	GATGATCTTGCCAATTCAGG		
Muck soil Group C	H1667	CTCCAAGCCTTCGTCCGATTC	62	107
2 sequences with similarity to Gammaproteobacteria	H1668	CGACCTTGTCATTGCCTCAC		
Muck soil Group D	H1677	CATTGCCGTGAAGAAGGTCGTC	62	111
5 sequences with similarity to Alphaproteobacteria	H1678	ACTTCTCATCGCCGTTAGC		
Muck soil Group E	H1669	GCGAAGGAGCCAAATCAGTG	62	125
37 sequences with similarity to Alphaproteobacteria	H1670	ATCGTTGGAGGTGACTTTCTTG		

To validate observed changes in sequence frequency between the microbial community libraries from the control and 1% FE soils at 14 days incubation and to quantify targets of interest throughout the bioassay time course, we designed sequence-specific SYBR green quantitative real-time PCR assays for five targets from the libraries as well as *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas fluorescens* was not identified in the *cpr60* libraries but has been reported by others to be a common soil constituent with known biocontrol functions. The targets are described in Table 3. Library targets were chosen based on their apparent difference in abundance between the control and FE libraries based on the clone frequency data. We were particularly interested in sequences that were detected only in the presence of FE or increased in the presence of FE (Groups A-D).

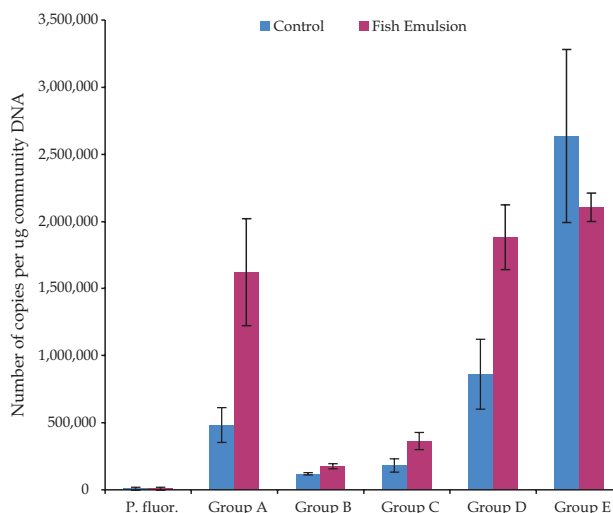
Throughout multiple DNA extractions from control and FE-amended muck soil, extracts from FE-amended soil were more concentrated (1.1 to 1.9 times more concentrated than control soil DNA extracts), likely due to an increased biological carrying capacity in the FE-amended soil. To compensate for this “fertilizer effect” and visualize changes in the proportional representation of soil targets, all quantitative real-time PCR results were reported as target copy number per microgram of extracted soil DNA.

Figure 3 shows the results of quantitative real-time PCR analysis of the six targets in the soil samples used for library construction. *Pseudomonas fluorescens* was detected at low levels in both samples ( $1.22 \times 10^4$  and  $1.29 \times 10^4$  copies/mg soil DNA in control and 1% FE soils respectively). Targets A-D were detected at higher levels in the 1% FE soil than in the control, with relative increases of 1.47 times (Group B) to 3.36 times (Group A). Group E was less abundant in the FE soil than in the control, decreasing from  $2.64 \times 10^6$  to  $2.11 \times 10^6$  copies/mg soil DNA. The trends in target abundance for Groups A-E reflect the differences in clone frequency reported in Table 4. Expressed as copy numbers per gram of soil, the range of target levels detected is  $7.3 \times 10^4$  copies/g for *Pseudomonas fluorescens* in the control soil sample compared to  $2.83 \times 10^7$  copies/gram for Group E.

**Table 4.** Targets for quantitative real-time PCR.

Target	Description	Frequency (% of clones)	
		CN	FE
Group A	3 sequences with similarity to Gammaproteobacteria (particularly <i>Xanthomonas</i> spp.), 60% G+C.	0.00	.37
Group B	2 sequences with similarity to Betaproteobacteria, 53% G+C.	0.0	.63
Group C	2 sequences with similarity to Gammaproteobacteria (particularly <i>Xanthomonas</i> spp.), 62% G+C	0.10	0.63
Group D	5 sequences with similarity to Alphaproteobacteria (particularly <i>Sphingomonas</i> spp.), 62% G+C	0.00	1.16
Group E	37 sequences with similarity to Alphaproteobacteria (particularly Rhizobiales)	24.86	5.55
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		0	0
<i>Burkholderia cepacia</i> complex		0	0

To examine the trends in relative target abundance throughout the bioassay time course, we quantified the six targets in control and 1% FE amended soils at 1, 7, 14, and 28 days incubation. The mean results did not reveal very significant differences because of the large variation in data caused likely as a result of the very small amounts of soils being sampled and because the increases in specific groups were limited to 2-3 fold increases rather than 20 fold increases. Nevertheless this approach provides great promise in that we can generate species specific primers from the *cpn60* sequences identified to characterize specific populations in real time even though we may not know who they are. By taking large samples of soil for DNA extraction we hope to be able to also identify fungal species in the samples which we did not find in this study. We are repeating some of this work using soils isolated from the rhizosphere rather than bulk soils.



**Figure 3.** Quantification of muck soil targets in control and 1% FE amended soil at 14 days incubation. Reported values are the mean of two experiments.

## Other Research Areas

The use of FE and LSM as a disease control strategy for soilborne diseases such as potato scab and verticillium wilt needs to be further validated in the context of improving soil organic matter content and for improvement of soil and crop health in general. The broadcast rates of FE effective against potato scab may not be economical and it is possible that banding or furrow applications can lower costs without compromising efficacy. LSM is more effective against potato scab and verticillium wilt in low pH soils, acidification of LSM may expand the range of soils where it can be effective. Also, LSM can be formulated to enhance its VFA contents with VFA-producing bacteria. There is also a need to conduct long-term studies with FE, LSM, and other similar material applied serially over time at lower rates that can be economically feasible. For instance, applying the material yearly at lower rates for several years may improve the efficacy over time for yield improvements and disease suppression.

## Conclusions

The demand for the use of organic amendment for managing soilborne diseases and enhancing soil fertility will continue to expand as an alternative to agrochemicals especially in organic production systems. Consistency in field efficacy of these and other organic soil amendments may stimulate conventional growers to adopt and integrate such practices as well. There is a great need to focus on the soil management practices that improve soil quality and health by maintaining the abundance and diversity of resident soil microbial communities, high population of beneficial organisms, and low population of plant pathogens and pests.



## References

- Abbasi, P.A.; Cuppels, D.A. & Lazarovits, G. Effect of foliar applications of neem oil and fish emulsion on bacterial spot and yield of tomatoes and peppers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 41-48. 2003.
- Abbasi, P.A.; Conn, K.L. & Lazarovits, G. Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* damping-off of radish and cucumber seedlings by addition of fish emulsion to peat mix or soil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 177-187. 2004.
- Abbasi, P.A.; Conn, K.L. & Lazarovits, G. Effect of fish emulsion used as a pre-plant soil amendment on verticillium wilt, common scab, and tuber yield of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 509-518. 2006.
- Abbasi, P.A. Lazarovits, G., & Jabaji-Hare, S. Detection of high concentrations of organic acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. *Phytopathology* 99: 274-281. 2009.
- Akhtar, M. & Mahmood, I. Suppression of nematode populations with animal by-products. *Bioresource Technology* 51: 269-271. 1995.
- Akhtar, M. & Malik, A. Roles of organic soil amendments and soil organisms in the biological control of plant-parasitic nematodes: a review. *Bioresource Technology* 74: 35-47. 2000.
- Alam, M.M. Effect of ammonia on the population of plant parasitic nematodes and growth of some vegetables. *Pakistan Journal of Nematology* 10: 133-137. 1992.
- Aung, L.H.; Flick, G.J.; Bluss, G.R.; Aycock, H.S.; Keefer, R.F.; Singh, R.; Brandon, D.M.; Griffin, J.L.; Hovermale, C.H. & Stutte, C.A. Growth responses of crop plants to fish soluble nutrients fertilization. Blacksburg. Virginia Polytechnic Institute and University. Bulletin 84-89. 1984.
- Bailey, K.L. & Lazarovits, G. Suppressing soil-borne diseases with residue management and organic amendments. *Soil and Tillage Research* 72: 169-180. 2003.
- Blatt, C.R. & McRae, K.B. Comparison of four organic amendments with a chemical fertilizer applied to three vegetables in rotation. *Canadian Journal of Plant Science* 78: 641-646. 1998.
- Borneman, J.; Skroch, P.W.; O'Sullivan, K.M.; Palus, J.A.; Rumjanek, N.G.; Jansen, J.L.; Nienhuis, J. & Triplett, E.W. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1935-1943. 1996.
- Bowman, J.P. & Sayler, G.S. Nucleic acid techniques in the environmental detection of microorganisms and their activities. In: Pickup, R.W. & Saunder, J.R. (Eds.) *Molecular approaches to environmental microbiology*. Toronto. Ellis Horwood. 1996. pp. 63-97.
- Brousseau, R.; Hill, J.E.; Prefontaine, G.; Goh, S.H.; Harel, J. & Hemmingsen, S.M. *Streptococcus suis* serotypes characterized by analysis of chaperonin 60 gene sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 4828-33. 2001.
- Browning, M.; Wallace, D.B.; Dawson, C.; Alm, S.R. & Amador, J.A. Potential of butyric acid for control of soil-borne fungal pathogens and nematodes affecting strawberries. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 401-404. 2006.
- Ceci, L. Fish fertilizer: a native North American practice? *Science (Washington, D.C.)* 188: 26-30. 1975.
- Chatellier, S.; Harel, J.; Zhang, Y.; Gottschalk, M.; Higgins, R.; Devriese, L.A., *et al.* Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 581-589. 1998.
- Chun, D. & Lockwood, J.L. Reductions of *Pythium ultimum*, *Thielaviopsis basicola*, and *Macrophomina phaseolina* populations in soil associated with ammonia generated from urea. *Plant Disease* 69: 154-158. 1985.
- Conn, K.L. & Lazarovits, G. Impact of animal manures on verticillium wilt, potato scab, and soil microbial populations. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21:81-92. 1999.
- Conn, K.L. & Lazarovits, G. Soil factors influencing the efficacy of liquid swine manure added to soil to kill *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 400-406. 2000.
- Conn, K.L. & Lazarovits, G. Reduction of potato scab with acidified liquid swine manure soil amendment. *Canadian Journal of Plant Pathology* 29: 440. 2007.
- Conn, K.L.; Tenuta, M. & Lazarovits, G. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95: 28-35. 2005.

- Conn, K.L.; Topp, E. & Lazarovits, G. Factors influencing the concentration of volatile fatty acids, ammonia, and other nutrients in stored liquid pig manure. *Journal of Environmental Quality* 36: 440-447. 2007.
- Dumonceaux T.J.; Hill J.E.; Hemmingsen, S.M. & Van Kessel A.G. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2815-2823. 2006.
- El-Tarabily, K.A.; Nassar, A.H.; Hardy, G.E.St.J. & Sivasithamparam, K. Fish emulsion as a food base for rhizobacteria promoting growth of radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*) in a sandy soil. *Plant and Soil* 252: 397-411. 2003.
- Filho, E.S. & Dhingra, O.D. Survival of *Macrophomina phaseolina* sclerotia in nitrogen amended soils. *Phytopathologische Zeitschrift* 97: 136-143. 1980.
- Gagnon, B. & Berrouard, S. Effects of several organic fertilizers on growth of greenhouse tomato transplants. *Canadian Journal of Plant Science* 74: 167-168. 1994.
- Gamliel, A. & Stapleton, J.J. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83: 899-905. 1993a.
- Gamliel, A. & Stapleton, J.J. Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. *Plant Disease* 77: 886-891. 1993b.
- Gilpatrick, J.D. Role of ammonia in the control of avocado root rot with alfalfa meal soil amendment. *Phytopathology* 59: 973-978. 1969.
- Goh, S.H.; Facklam, R.R.; Chang, M.; Burns, E.C.M.; Tyrrell, G.J.; Hill, J.E.; Chan, D.; He, C.; Rahim, T.; Shaw, C. & Hemmingsen, S.M. Identification of *Enterococcus* species and phenotypically similar *Lactococcus* and *Vagococcus* species by reverse checkerboard hybridization to Chaperonin 60 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3953-3959. 2000.
- Gorissen, A.; van Overbeek, I.S. & van Elsas, J.D. Pig slurry reduces the survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in soil. *Canadian Journal of Microbiology* 50: 587-593. 2004.
- Haruta, S.; Kondo, M.; Nakamura, K.; Aiba, H.; Ueno, S.; Ishii, M. & Igarashi, Y. Microbial community changes during organic solid waste treatment analyzed by double gradient-denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence *in situ* hybridization. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 224-231. 2002.
- Hemmingsen, S.M.; Woolford, C.; van der Vies, S.M.; Tilly, K.; Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P. *et al.* Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333: 330-334. 1988.
- Henis, Y. & Chet, I. Mode of action of ammonia on *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 57: 425-427. 1967.
- Hill, J.E.; Seipp, R.P.; Betts, M.; Hawkins, L.; Van Kessel, A.G.; Crosby, W.L. & Hemmingsen, S.M. Extensive profiling of a complex microbial community using high throughput sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3055-3066. 2002.
- Hill, J.E.; Goh, S.H.; Money, D.M.; Doyle, M.; Li, A.; Crosby, W.L.; Links, M.; Leung, A.; Chan, D. & Hemmingsen, S.M. Characterization of vaginal microflora of healthy, non-pregnant women using chaperonin-60 sequence-based methods. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 193(3 Pt 1): 682-692. 2005a.
- Hill, J.E.; Hemmingsen, S.M.; Goldade, B.; Dumonceaux, T.; Klassen, J.; Zijlstra, R.T.; Goh, S.H. & Van Kessel, A.G. Comparison of ileum microflora of pigs fed corn, wheat or barley-based diets using chaperonin-60 sequencing and quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 867-875. 2005b.
- Hill, J.E.; Town, J.R. & Hemmingsen, S.M. Improved template representation in *cpn60* PCR product libraries generated from complex templates by application of a specific mixture of PCR primers. *Environmental Microbiology* 8: 741-746. 2006.
- Hoitink, H.A.J. & Boehm, M.J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: a substrate-dependent phenomenon. *Annual Review of Phytopathology* 37: 427-446. 1999.
- Howell, C.R.; Beier, R.C. & Stipanovic, R.D. Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* pre-emergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology* 78: 1075-1078. 1988.
- Huber, D.M. & Watson, R.D. Effect of organic amendment on soil-borne plant pathogens. *Phytopathology* 60: 22-26. 1970.
- Kaplan, M. & Noe, J.P. Effects of chicken-excrement amendments on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 25: 71-77. 1993.

- Lazarovits, G. Management of soilborne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 1-7. 2001.
- Lazarovits, G. Managing soilborne plant diseases through selective soil disinfestation by a knowledge based application of soil amendments. *Phytoparasitica* 32: 427-431. 2004.
- Lazarovits, G.; Tenuta, M. & Conn, K.L. Organic amendments as a disease control strategy for soilborne diseases of high-value agricultural crops. *Australasian Plant Pathology* 30: 111-117. 2001.
- Lazarovits, G.; Conn, K.L.; Abbasi, P.A. & Tenuta, M. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. *Acta Horticulturae* 698:215-225. 2005.
- Linderman, R.G. & Gilbert, R.G. Influence of volatiles of plant origin on soil-borne plant pathogens. In: Bruehl, G.W. (Ed.) *Biology and control of soil-borne plant pathogens*. St. Paul. APS. 1975.
- Löffler, H.J.M. & Schippers, B. Ammonia-induced mycostasis is not mediated by enhanced release of carbon compounds. *Canadian Journal of Microbiology* 30: 1038-1041. 1984.
- Mazzola, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. *Annual Review of Phytopathology* 42: 35-59. 2004.
- Mazzola, M.; Granatstein, D.M.; Elfving, D.C. & Mullinix, K. Suppression of specific apple root by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content. *Phytopathology* 91: 673-679. 2001.
- Mazzola, M.; Brown, J.; Izzo, A.D. & Cohne, M.F. Mechanism of action and efficacy of seed meal-induced pathogen suppression differ in *Brassica* species and time-dependent manner. *Phytopathology* 97: 454-460. 2007.
- Oka, Y.; Chet, I. & Spiegel, Y. Control of rootknot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus*. *Biocontrol Science & Technology* 3: 115-126. 1993.
- Ogram, A. & Sharma, K. Methods of soil microbial community analysis. In: Hurst, C.J.; R.L. Crawford; G.R. Knudsen; M.J. McInerney & L.D. Stetzenbach (Eds.) *Manual of Environmental Microbiology*. Washington, DC. American Society of Microbiology Press. 2002. pp. 554-563.
- Pavlica, D.A.; Hora, T.S.; Bradshaw, J.J.; Skogerboe, R.K. & Baker, R. Volatiles from soil influencing activities of soil fungi. *Phytopathology* 68: 758-765. 1978.
- Punja, Z.K. & Grogan, R.G. Effects of inorganic salts, carbonate-bicarbonate anions, ammonia, and the modifying influence of pH on sclerotial germination of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 72: 635-639. 1982.
- Rush, C.M. & Lyda, S.D. Effects of anhydrous ammonia on mycelium and sclerotia of *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathology* 72: 1085-1089. 1982.
- Saibil, H.R. & Ranson, N.A. The chaperonin folding machine. *Trends in Biochemical Science* 27: 627-632. 2002.
- Schwieger, F. & Tebbe, C.C. Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target plant (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*)-linking of 16S rRNA gene-based single-strand conformation polymorphism community profiles to the diversity of cultivated bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3556-3565. 2000.
- Sigler, W.V.; Nakatsu, C.H.; Reicher, Z.J. & Turco, R.F. Fate of the biological control agent *Pseudomonas aureofaciens* TX-1 after application to turfgrass. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3542-3548. 2001.
- Tenuta, M. & Lazarovits, G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92: 255-264. 2002a.
- Tenuta, M. & Lazarovits, G. Identification of specific soil properties that affect the accumulation and toxicity of ammonia to *Verticillium dahliae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 24: 219-229. 2002b.
- Tenuta, M. & Lazarovits, G. Soil properties associated with the variable effectiveness of meat and bone meal to kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Applied Soil Ecology* 25: 219-236. 2004.
- Tenuta, M.; Conn, K.L. & Lazarovits, G. Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 92: 548-452. 2002.
- Trankner, A. Use of agricultural and municipal organic wastes to develop suppressiveness to plant pathogens. In: Tjamos, E. S.; G.C. Papavizas & R.J. Cook (Eds.) *Biological Control of Plant Diseases*. New York. Plenum Press. 1992. pp. 35-42.

- Trüper, H.G. & de Clari, L. Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns) "in apposition". *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 908-909. 1997.
- Tsao, P.H. & Oster, J.J. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic substances. *Phytopathology* 71: 53-59. 1981.
- Voisard, C.; Keel, C.; Haas, D. & Defago, G. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal* 8: 351-358. 1989.
- Waksman, S.A. & Starkey, R.L. *The Soil and the Microbe*. New York. John Willey & Sons. 1931.
- Warren, K.S. Ammonia toxicity and pH. *Nature* 195: 47-49. 1962.
- Weller, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407. 1998.
- Weller, D.M.; Raaijmakers, J.M.; McSpadden Gardener, B.B. & Thomashow, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40: 309-348. 2002.
- Wilhelm, S. Effect of various soil amendments on the inoculum potential of the *Verticillium* wilt fungus. *Phytopathology* 41: 684-690. 1951.
- Xiao, J.; Zhu, J.; Chen, S.; Ruan, W. & Miller, C. A novel use of anaerobically digested liquid swine manure to potentially control soybean cyst nematode. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 42: 749-757. 2007.
- Zakaria, M.A. & Lockwood, J.L. Reduction in *Fusarium* populations in soil by oilseed meal amendments. *Phytopathology* 70: 240-243. 1980.
- Zakaria, M.A.; Lockwood, J.L. & Filonow, A.B. Reduction in *Fusarium* population density in soil by volatile degradation products of oilseed meal amendments. *Phytopathology* 70: 495-499. 1980.

## Capítulo 5

# Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos

Tiago Domingues Zucchi & Itamar Soares de Melo\*

*Embrapa Meio Ambiente, CP 69; 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: tdzucchi@terra.com.br;  
itamar@cnpma.embrapa.br. \*Bolsista do CNPq.*

## Introdução

Na Inglaterra, em 1969, mais de 100.000 perus morreram de uma doença conhecida até então como “Doença X do peru”. Essa doença foi relacionada ao amendoim contido na dieta dessas aves. Posteriormente, constatou-se que os grãos estavam contaminados com o fungo *Aspergillus flavus* e que alguns metabólitos desse fungo, conhecidos hoje como aflatoxinas, foram responsáveis pela morte das aves (Papp *et al.*, 2002). Esse episódio serviu para alertar a comunidade científica sobre a importância dos possíveis compostos nocivos produzidos por fungos. Essas substâncias foram denominadas micotoxinas.

Muitas micotoxinas são classificadas como policetônicos, que são metabólitos secundários biorreativos sintetizados como ácidos graxos (Hopwood & Sherman, 1990). Apesar de alguns policetônicos (por exemplo, antibióticos e drogas anticâncer) serem benéficos, os policetônicos micotoxigênicos representam um problema sério para a saúde humana e animal, além de causar sérios danos econômicos (Keller *et al.*, 1994).

As micotoxinas podem ser definidas como um grupo de metabólitos secundários produzidos por diversos tipos de fungos filamentosos, tais como as espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* entre outros (Sweeney & Dobson, 1999). Além disso, alguns fungos são capazes de produzir mais de uma micotoxina e algumas são produzidas por mais de uma espécie de fungo (Hussein & Brasel, 2001). Segundo Papp *et al.* (2002), mais de 200 tipos de toxinas fúngicas já foram identificadas e esse número não para de crescer.

As micotoxinas são formadas durante o crescimento do fungo. Esses compostos podem estar presentes apenas no fungo, enquanto outros são excretados no meio, ou seja, nos alimentos em geral (Filtenborg *et al.*, 1996). Além disso, como a produção dessas toxinas está diretamente relacionada ao desenvolvimento do fungo, a contaminação dos alimentos pode ocorrer no campo, antes e após a colheita e durante o transporte e armazenamento do produto (Caldas *et al.*, 2002). Como esses compostos são extremamente resistentes aos tratamentos físicos e químicos, uma vez que as micotoxinas contaminam os alimentos, como regra geral, permanecem neles durante o processamento e estocagem (Scott *et al.*, 1992).

As aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, tricotecenos, zearelona, toxinas tremogênicas e ergotoxina estão entre as micotoxinas de maior impacto para a saúde humana e animal. Esses compostos apresentam efeitos adversos em humanos, animais e culturas, os quais resultam em doenças e danos econômicos (Hussein & Brasel, 2001). De acordo com a FDA (Food & Drug Administration, EUA), devido à queda de produtividade, essas perdas econômicas chegam próximo a US\$1 bilhão/ano e mais US\$0,5 milhão/ano para custos de mitigação de apenas três micotoxinas: aflatoxinas, fumonisinas e tricotecenos (*in* Bhatnagar *et al.*, 2006).

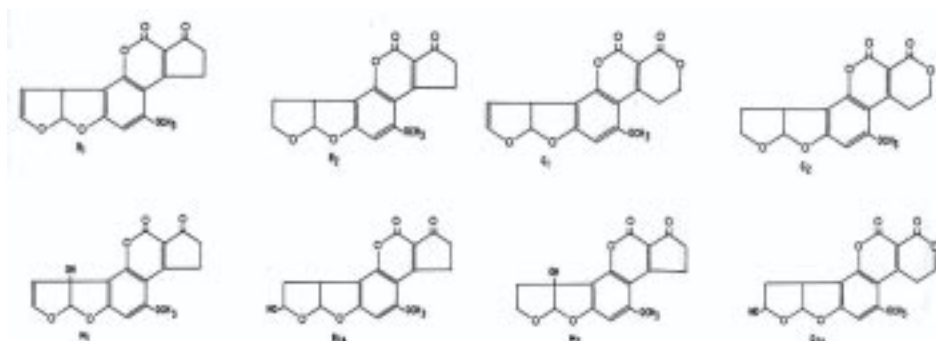
Devido a esses problemas, diversas estratégias têm sido propostas para controlar os fungos micotoxigênicos diminuindo, assim, a concentração desses compostos nos alimentos. Esses estudos envolvem desde fungicidas, controle físico, controle biológico, substâncias inibidoras originárias de plantas ou microrganismos até o uso de engenharia genética para resistência de plantas. Entretanto, muitas dessas estratégias apresentam efeitos limitados (Yan *et al.*, 2004).

No caso das aflatoxinas, o uso de agentes biológicos competidores/antagonistas a *Aspergillus* spp. tem se mostrado uma metodologia viável e promissora. Além disso, o controle biológico de fitopatógenos tem sido estimulado nos últimos anos principalmente pela percepção pública sobre os riscos dos agrotóxicos (Raaijmakers *et al.*, 2002). Essa preocupação é devida, em grande parte, aos efeitos desses compostos no ambiente, em organismos não-alvos e na possibilidade de carcinogenicidade de alguns agrotóxicos. Outro problema relacionado ao uso dessas substâncias inclui a seleção de linhagens de patógenos resistentes, levando-se à gradual eliminação dos fungicidas disponíveis (Heydari & Misaghi, 1998). Neste capítulo será abordado como o controle biológico vem sendo utilizado para diminuir a contaminação de aflatoxinas nos alimentos.

## Aflatoxina

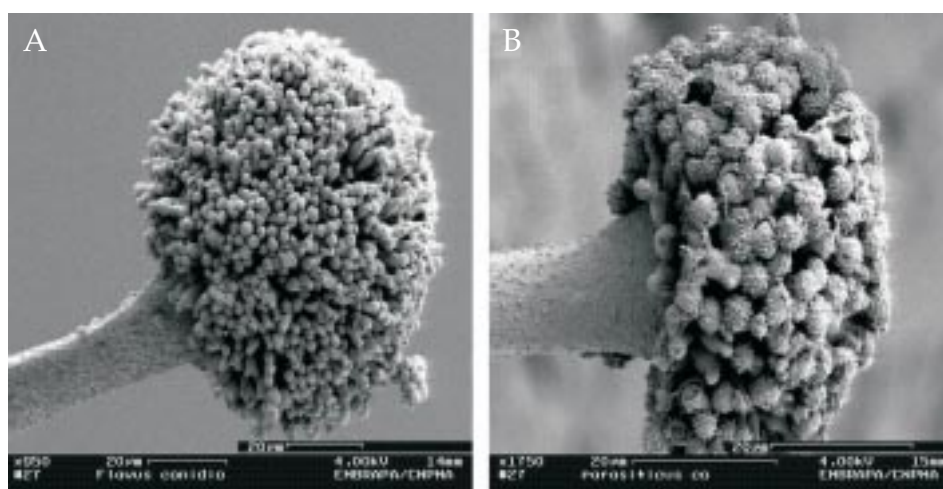
Entre todas as micotoxinas conhecidas, as aflatoxinas produzidas pelas espécies de *Aspergillus* continuam a ser as mais estudadas e compreendidas. Esse fato deve-se principalmente a dois fatores: a habilidade desse fungo em colonizar uma grande variedade de produtos agrícolas (O'Brian *et al.*, 2003) e a aflatoxina B<sub>1</sub> ser reconhecida como o mais potente agente carcinogênico natural conhecido, além de ser teratogênica e mutagênica (Shenasi *et al.*, 2002).

O grupo das aflatoxinas divide-se em quatro metabólitos principais: aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, respectivamente) (Figura 1). Há ainda o tipo M<sub>1</sub> encontrada no leite e produtos lácteos como resultado direto da ingestão de rações contaminadas com AFB<sub>1</sub>, durante a alimentação do gado (López *et al.*, 2003). Esse composto pode ser detectado no leite entre 12 e 24 h após a primeira ingestão e é considerado tão tóxico quanto a AFB<sub>1</sub> para aves e ratos (López *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Estrutura das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, B<sub>2A</sub> e G<sub>2A</sub>

Diversos fungos filamentosos, incluindo espécies de *Penicillium* e uma espécie pertencente ao gênero *Chaetomium*, são relatadas como produtoras de esterigmatocistina e outros precursores da aflatoxina (Barnes *et al.*, 1994). Entretanto, apenas algumas espécies de *Aspergillus* são capazes de produzir aflatoxinas, sendo que *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* (Figura 2) são as mais comumente relacionadas com contaminação por essa micotoxina (Cotty *et al.*, 1994). Além disso, *Aspergillus parasiticus* é reportado como produtor tanto das AFB<sub>1</sub> e AFB<sub>2</sub> como das AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>, enquanto *Aspergillus flavus* raramente produz as AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub> (Klich & Pitt, 1988).



**Figura 2.** Microscopia eletrônica de varredura dos conidióforos de *Aspergillus flavus* (A) e *Aspergillus parasiticus* (B), respectivamente (Zucchi, 2007).

Apesar de as espécies desse gênero distribuírem-se por todo o globo terrestre, são particularmente mais abundantes na região compreendida entre as latitudes 26°N e 35°S (Klich *et al.*, 1994). Devido à capacidade de *Aspergillus* spp. desenvolverem-se em temperaturas elevadas e com atividade de água ( $a_w$ ) relativamente baixa, essas espécies são capazes de colonizar diversos tipos de grãos e castanhas (CAST, 2003). Esses fatores ambientais juntamente com condições inadequadas de armazenamento de grãos tornam a contaminação por aflatoxina um problema sério, principalmente, nos países em desenvolvimento.

## Toxicidade e Legislação

As aflatoxinas produzem aberrações cromossômicas, síntese de DNA não programada, troca de cromátides irmãs, quebras no cromossomo e ligações com o DNA de células humanas (Wang & Groopman, 1999). Além disso, a AFB<sub>1</sub> foi relatada como sendo inibidora da síntese de DNA, da síntese de RNA mensageiro e consequentemente da síntese de proteínas (McLean & Dutton, 1995). Ademais, analisando os efeitos dessa micotoxina em ratos, Eaton & Gallagher (1994) sugeriram que a exposição crônica, mesmo em pequenas concentrações, é objeto de preocupação.

Flannigan (1991) determinou os valores de dose letal (DL<sub>50</sub>) para AFB<sub>1</sub> entre 1,0 mg/kg e 17,9 mg/kg de peso vivo em animais de laboratórios. Entretanto, frangos de 1 dia mostraram-se particularmente mais sensíveis, estando os valores da DL<sub>50</sub> próximos a 0,5 mg/kg. Verifica-se a indução de toxicidade crônica quando ingerido em doses subletais. McLean & Dutton (1995) demonstraram que baixas doses em exposição crônica resultam em neoplasia, principalmente câncer de fígado, em diversas espécies animais.

As rações contaminadas com aflatoxinas podem causar diminuição na eficiência da ração, queda no índice de reprodutividade, retardo no crescimento e elevação na taxa de mortalidade de animais, assim como um decréscimo na produção de alimentos derivados desses animais (Diekman & Green, 1992; Bintvihok *et al.*, 2003). Esses fatores levam a uma perda substancial de produtividade e degradação da qualidade da carne (Rustom, 1997). Em 1986, houve prejuízo de aproximadamente US\$ 140 milhões como consequência direta da perda de peso de frangos-galeto em decorrência do consumo de baixos níveis de aflatoxinas (Palmgreen & Hayes, 1987). Em humanos, a ingestão de aflatoxinas é associada com hepatotoxicidade (Dvorackova, 1990). Além disso, estudos epidemiológicos também indicam que áreas com altos níveis de aflatoxinas são correlacionadas com alta incidência de câncer do fígado (Trail *et al.*, 1995).

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado é questão de saúde pública no mundo todo. Embora países europeus e os EUA possuam regulação rigorosa para as mais diversas micotoxinas, no Brasil, existe legislação específica apenas para as aflatoxinas. Segundo Caldas *et al.* (2002), o Ministério da Saúde estabelece o limite de 30 µg/kg de AFB<sub>1</sub>+AFG, em alimentos de consumo humano e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento



estabelece 20 µg/kg de AF totais para matérias-primas de alimentos e rações. Esses valores ainda são considerados altos quando comparados com os de países europeus, onde para AF totais em qualquer tipo de alimento, os valores variam de 1 µg/kg (Bósnia) a 10 µg/kg (França) (Tabela 1) (Creppy, 2002).

**Tabela 1.** Limite máximo de micotoxinas em alimentos nos países europeus e EUA.

Micotoxina	Países	Limites máximos (µg/kg ou µg/l)	Alimentos	
Aflatoxina B <sub>1</sub>	Alemanha	2	Todos	
	Bélgica	5	Todos	
	Finlândia	2	Todos	
	Portugal		25	Amendoim
			5	Alimento para criança
			20	Outros
	Suíça		1	Todos
		2	Milho e cereais	
Aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub>	França	10	Todos	
	EUA	20	Todos	
	Bélgica	5	Amendoim	
	Bósnia	1	Todos	
	Noruega	5	Amendoim e castanhas	
Aflatoxina M <sub>1</sub>	Rússia	0,5	-	
	Bélgica		0,05	Leite
			0,5	Leite
	França	0,03	Leite para criança	
	Holanda		0,05	Leite
			0,02	Mateiga
		0,2	Queijo	

Fonte: modificado de Creppy (2002).

## Controle Biológico de Fungos Aflatoxigênicos

O controle biológico tem se mostrado uma estratégia promissora na redução de contaminação de grãos por aflatoxina, tanto em pré- como em pós-colheita (Dorner & Cole, 2002). Diversas tecnologias vêm sendo desenvolvidas, mas poucas chegaram a sair dos laboratórios. Dentre essas técnicas destacam-se o uso de linhagens de *Aspergillus* não produtoras de AF; bactérias; actinobactérias e leveduras.

**Uso de linhagens de *Aspergillus* não produtoras de aflatoxina.** Uma metodologia que é empregada em campo é a aplicação de linhagens de *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* não produtoras de aflatoxinas, de ácido ciclopiazônico e de nenhum outro precursor da aflatoxina, diretamente no solo ao redor da planta em desenvolvimento. Essas linhagens competem pelo mesmo nicho ecológico que as linhagens produtoras de aflatoxina no campo. Com essa competição, é esperada uma redução no potencial de inóculo da linhagem aflatoxigênica e conseqüentemente redução na produção de aflatoxina. A linhagem não-aflatoxigênica pode por ventura infectar culturas susceptíveis, como o amendoim. Mas mesmo com essa infecção, não haverá contaminação, pois essa linhagem invasora não produz AF (Dorner, 2005).

Utilizando essa tecnologia, Dorner *et al.* (2003) constataram que a concentração de AF em amendoim colhido reduziu significativamente (cerca de 90%) ao longo de dois anos de cultivo. Da mesma maneira, Cotty & Bhatnagar (1994) demonstraram que uma linhagem de *Aspergillus flavus*, produtora de muitas das enzimas envolvidas na biossíntese da aflatoxina, mas não produtora de AF, foi a mais eficiente na redução da contaminação em casa-de-vegetação. Além disso, devido ao melhor entendimento da via de regulação da AF, a eficácia dessas linhagens competidoras pode ser melhorada por meio de engenharia genética (Bhatnagar *et al.*, 2006). Entretanto, o uso de linhagens de *Aspergillus* não produtoras de AF possui uma desvantagem. Algumas dessas linhagens não aflatoxigênicas são instáveis e podem se converter em fenótipo produtor de aflatoxina (Brown *et al.*, 1991). Assim, apesar de os resultados promissores encontrados em alguns trabalhos, a estabilidade genética de linhagens não-aflatoxigênicas deve ser levada em conta num programa de seleção.

Até o momento, apenas dois produtos comerciais que utilizam formulações de fungos não-aflatoxigênicos estão disponíveis no mercado: Afla-guard® – registrado para uso em cultura de amendoim e *Aspergillus flavus* AF-36 – aprovado para uso em cultura de algodão (Dorner, 2005). Mas devido aos avanços e vantagens dessas linhagens na diminuição da contaminação por AF, muito em breve novas formulações deverão ser aprovadas para uso comercial.

**Uso de bactérias antagonicas.** No mercado há diversas linhagens comerciais de bactérias disponíveis para o controle dos mais variados fitopatógenos (Tabela 2). Essas bactérias de controle biológico podem ser aplicadas como produtos secos (granulados ou pó), suspensão de células (com ou sem microencapsulamento) ou tratamento de sementes (Schisler *et al.*, 2004).

**Tabela 2.** Linhagens de bactérias disponíveis comercialmente para o controle de fitopatógenos.

Agentes de controle	Linhagens	Nomes comerciais	Empresas
<i>Bacillus subtilis</i>	GB03	Kodiak®	Gustafson
	MBI600	Subtilex®	Becker Underwood
	QST713	Serenade®	AgraQuest
	BD170	BioPro®	Andermatt Bioc.
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	MA342	Cedomon®	BioAgri
	MA342	Cerall®	BioAgri
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	A506	Blightban®	Nufarm Inc.
<i>Bacillus pumilus</i>	GB34	YieldShield®	Gustafson
	QST713	Rhapsody®	AgraQuest
	QST2808	Sonata®	AgraQuest
	QST2808	Ballad®	AgraQuest
<i>Bacillus liqueniformis</i>	SB3086	EcoGuard®	Novozymes
<i>Bacillus subtilis</i> + <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GB12+GB99	BioYield®	Gustafson

No caso de fungos aflatoxigênicos, há poucas linhagens registradas e/ou certificadas para uso específico contra esses fitopatógenos. Entretanto, muitos trabalhos (em sua grande maioria *in vitro*) têm demonstrado que o uso de bactérias pode ser tornar uma alternativa viável no controle de *Aspergillus* spp. Essas pesquisas podem ser divididas em três linhas distintas: prospecção de novas biomoléculas ativas contra *Aspergillus* (antibióticos); seleção de linhagens produtoras de enzimas líticas (quitinase e endoglicanase) e, mais recentemente, uso de ácido láctico de bactéria. Alguns exemplos dessas metodologias e seu potencial no controle de fungos aflatoxigênicos serão relatados a seguir.

**Biomoléculas.** Diversas espécies de bactérias são capazes de oferecer algum efeito antagonico, por meio da produção de compostos orgânicos bioativos, às espécies de *Aspergillus*, diminuindo em maior ou menor grau a síntese de AF. Bottone & Pelluso (2003) relataram uma linhagem de *Bacillus pumilus* capaz de produzir um composto de baixo peso molecular que apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus* spp., inibindo a germinação dos esporos e o desenvolvimento das hifas. Em trabalho semelhante, linhagens isoladas de *Bacillus pumilus* foram capazes de inibir a produção de AF da linhagem NRRL 2999 de *Aspergillus parasiticus*. Essa inibição foi devida à produção de um metabólito extracelular pela bactéria durante o seu desenvolvimento (Munimbazi & Bullerman, 1998).

Nesci *et al.* (2005) isolaram linhagens de *Bacillus subtilis* e de *Pseudomonas solonacearum* que apresentaram um forte antagonismo a *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Ambos os fungos tiveram visível redução no seu crescimento nos testes de antagonismo. Essas linhagens de bactérias foram também eficazes na inibição do acúmulo de AFB<sub>1</sub> *in vitro*. Em outro trabalho, isolados de *Bacillus subtilis* foram capazes de inibir o crescimento de *Aspergillus flavus* em milho e *Aspergillus parasiticus* em amendoim (Kimura & Hirano, 1988).

Além das espécies de *Bacillus* e de *Pseudomonas*, outros gêneros de bactérias também são relatados por produzir compostos antagonicos contra fungos aflatoxigênicos. Um exemplo recente foi dado por Yadav *et al.* (2005), que apresentaram o primeiro relato dos efeitos supressivos das moléculas bioativas de *Escherichia coli* sobre *Aspergillus* spp. Entretanto, os compostos produzidos por essa linhagem ainda não foram identificados.

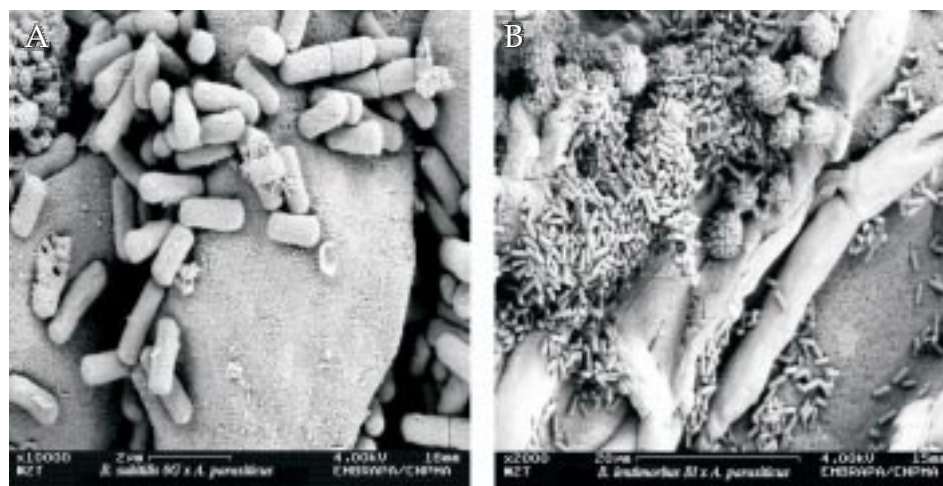
Apesar da diversidade de bactérias que produzem metabólitos contra fungos aflatoxigênicos, existem poucos trabalhos que os identifiquem de fato. Uma exceção foi a identificação de um ciclodipeptídeo, ciclo(L-Leu-L-Pro), capaz de afetar a produção de aflatoxina, regulando-a (Yan *et al.*, 2004). A identificação dos metabólitos bioativos de bactérias é importante, pois caso esses compostos sejam pouco tóxicos (aos seres humanos e animais) poderiam ser usados para fabricação de novas formulações contra esses fitopatógenos.

**Enzimas líticas (quitinases).** Os fungos filamentosos, em geral, possuem parede celular composta principalmente de quitina associada a proteínas e outros carboidratos, tais como  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6-glicanas (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). A quitina é um homopolímero com ligação 1,4- $\beta$  N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), sendo degradada pela ação das quitinases que hidrolisam as ligações 1,4- $\beta$ . Essas enzimas são divididas em endoquitinases e exoquitinases ou quitinobiosidase.

As endoquitinases são enzimas que catalizam aleatoriamente a hidrólise das ligações 1,4- $\beta$  de GlcNAc em toda a extensão da microfibrila da quitina. As exoquitinases catalizam a liberação de unidades de diacetil-quitobiose das cadeias de quitina (Chernin *et al.*, 1995).

Vários organismos (vírus, bactérias, fungos, plantas e animais) produzem quitinases com funções diversas em cada um deles. Por exemplo, nas bactérias, as quitinases mostram-se importantes na digestão da quitina para utilizá-la como fonte de carbono e energia (Wang & Chang, 1997). Além disso, quitinases de bactérias e fungos são comumente associadas ao micoparasitismo (Haran *et al.*, 1996), enquanto nas plantas estão associadas à proteção contra fitopatógenos e insetos (Graham & Sticklen, 1994).

A habilidade das bactérias em parasitar e degradar esporos e hifas de fungos patogênicos está amplamente descrita na literatura (Whipps, 2001). Esse parasitismo leva a uma inibição do crescimento do fungo e pode abranger desde a simples fixação de células às hifas, até a sua completa quebra e degradação. A aderência da célula de bactérias às hifas ocorre muitas vezes devido à produção de biofilme (Whipps, 2001). Zucchi (2007) demonstrou que linhagens de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus*, produtoras de quitinase, são capazes de parasitar *Aspergillus parasiticus* (Figura 3).



**Figura 3.** Eletromicrografia mostrando o micoparasitismo das linhagens antagônicas contra o fungo aflatoxigênico. A. *Bacillus subtilis* 0G x *Aspergillus parasiticus*. B. *Paenibacillus lentimorbus* BL x *Aspergillus parasiticus*.

Em razão da capacidade em degradar a parede celular de fungos filamentosos, tais como espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Colletotrichum* entre outros, as quitinases são consideradas uma importante aliada no controle de fungos fitopatogênicos. Além disso, por apresentarem baixa toxicidade para humanos e animais, os genes responsáveis pela produção dessas enzimas vêm sendo inseridos em plantas, por técnicas de transgenia, para torná-las resistente aos fitopatógenos (Melchers & Stuiver, 2000). Entretanto, até o momento, não foi realizado nenhum trabalho para avaliar o potencial inibitório dessas plantas transgênicas sobre *Aspergillus* spp.

**Ácido lático de bactéria (LAB).** O ácido lático de bactéria (LAB) é usado para a detoxificação ou inibição da síntese de AF. Assim, o uso de bactérias que possuam a habilidade de remover aflatoxina do meio vem sendo largamente estudado. Algumas dessas substâncias também apresentam propriedades anticarcinogênicas (Goldin & Gorbach, 1984). Em muitos estudos, foi mostrada a habilidade de algumas espécies produzirem diversos tipos de LAB que interagem ou removem a AF do meio ou inibem a germinação dos esporos de fungos aflatoxigênicos. Onilude *et al.* (2005) demonstraram que por meio da produção de LAB, *Lactobacillus planarum* inibe o crescimento vegetativo e esporulação de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, enquanto *Lactobacillus brevis* e *Lactococcus* spp. inibem apenas *Aspergillus parasiticus*.

As linhagens de *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus lactis* reduzem em mais de 20% a concentração de AF no meio e uma linhagem de *Lactobacillus rhamnosus* reduz a concentração em até 45% (Zinedine *et al.*, 2005). Essa remoção específica da toxina se dá por meio de uma ligação física formando um complexo entre o fator produzido pelas bactérias e a AFB<sub>1</sub> (Haskard *et al.*, 2001). Além disso, Oatley *et al.* (2000) demonstraram que quando a AF encontra-se ligada a esse fator, a micotoxina torna-se inviável para absorção pelo trato digestivo. Essas descobertas sugerem que as linhagens produtoras de LAB podem ser exploradas numa metodologia para detoxificação, em condições de armazenamento, de alimentos contaminados com aflatoxinas e/ou impedirem o desenvolvimento de *Aspergillus* spp. (Onilude *et al.*, 2005).

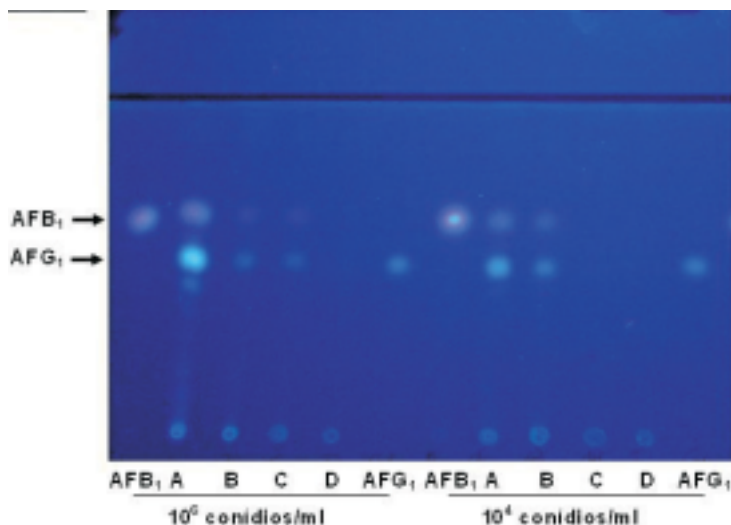
**Uso de actinobactérias.** As bactérias filamentosas são intensamente exploradas como fontes de inseticidas, fungicidas, antibióticos, agentes anticâncer e enzimas (Ōmura & Crump, 2004; von Bubnoff, 2006; Clardy *et al.*, 2006; Guimarães *et al.*, 2006; van Wezel *et al.*, 2006). Essas actinobactérias também produzem metabólitos secundários que podem ser utilizados como biorremediadores, atuando, por exemplo, na biodegradação de agrotóxicos (de Schrijver & de Mot, 1999; Watanabe, 2001). Podem, ainda, ser exploradas como células hospedeiras para a produção de proteínas recombinantes (Nakashima *et al.*, 2005). No entanto, a maioria desses estudos concentra-se em um único gênero de actinobactérias, *Streptomyces*, o qual é facilmente isolado e cultivado em amostras de origens diversas. Atualmente, devido a essa predileção por *Streptomyces*, pode-se dizer que existe um completo desconhecimento do potencial biotecnológico dos demais gêneros de actinobactérias (Clardy *et al.*, 2006; van Wezel, 2006). A ordem Actinomycetales é a maior fonte de antibióticos conhecidos com cerca de 3.000 moléculas, sendo 90% produzidas pelo gênero *Streptomyces* (Clardy *et al.*, 2006). Além disso, dos mais de 6.000 antibióticos descritos nos últimos anos, cerca de 65% são produzidos pelas espécies de *Streptomyces* (Araújo, 1998).

Esse imenso potencial de *Streptomyces* spp. em produzir moléculas de interesse biotecnológico, reflete também na escolha desse gênero de actinobactéria para o controle de fitopatógenos. No caso de fungos aflatoxigênicos, o uso de *Streptomyces* spp. é largamente estudado tanto para produção de enzimas líticas como metabólitos secundários que apresentem algum grau de controle.

Com relação às enzimas líticas, as pesquisas com actinobactérias para o controle de *Aspergillus* spp. concentram-se principalmente nas quitinases. Gomes *et al.* (2001) descreveram uma linhagem de *Streptomyces* sp. RC1071, isolada de solo do cerrado, como sendo produtora de enzimas líticas com ação para diversos fungos patogênicos, inclusive *Aspergillus parasiticus*. Esses autores relataram uma inibição de aproximadamente 15% a esse fungo.

Os metabólitos secundários produzidos por actinobactérias têm se mostrado efetivos no controle de *Aspergillus* spp. Em um trabalho recente, foi demonstrado que *Streptomyces maritimus* produz um fator de citotoxicidade moderada, extraído com acetato de etila, capaz de inibir o desenvolvimento de *Aspergillus flavus* (Al-Bari *et al.*, 2007). Alguns compostos isolados de *Streptomyces* sp. (aflastatinas A e B, blasticidina A e dioclatina A) inibiram a produção de AF, mas não o crescimento do fungo (Sakuda *et al.*, 1996; Sakuda *et al.*, 1999; Sakuda *et al.*, 2000a, b; Yoshinari *et al.*, 2007).

A maioria das pesquisas que envolve o controle de fungos aflatoxigênicos por espécies de bactérias filamentosas é realizada apenas *in vitro*. Uma exceção a essa regra foi demonstrada por Zucchi *et al.* (2008) em testes *in vivo*, nos quais a linhagem de *Streptomyces* sp. ASBV-1 foi capaz de controlar o desenvolvimento do *Aspergillus parasiticus* diretamente nos grãos de amendoim e diminuir drasticamente a produção de aflatoxina (Figura 4). Como mecanismo de controle constatou-se que a ASBV-1 produz quitinase e um composto orgânico, ambos com atividade contra *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* (Zucchi, 2007). Até o momento, os esforços têm sido na identificação do composto orgânico e, como resultados preliminares, sabe-se que essa molécula pertence à classe dos triterpenos, possuindo uma longa cadeia de ácidos graxos.



**Figura 4.** Cromatografia de Camada Delgada (CCD) para detecção da produção das aflatoxinas B<sub>1</sub> e G<sub>1</sub> após tratamento das sementes de amendoim com a linhagem *Streptomyces* sp. ASBV-1. A. controle; B. patógeno inoculado 24 h antes do agente de controle; C. patógeno inoculado no mesmo dia que o agente de controle; D. patógeno inoculado 24 h após a inoculação da actinobactéria (modificado de Zucchi, 2007).

Apesar de existirem no mercado linhagens de bactérias filamentosas registradas para o controle de fitopatógenos (Tabela 3), nenhuma linhagem comercial está sendo usada para o controle de *Aspergillus* spp.

**Tabela 3.** Produtos comerciais de controle biológico contendo linhagens de actinobactéria.

Nome comercial	Espécie	Fitopatógeno-alvo	Formulação	Empresa
Actinovate®	<i>Streptomyces lydicus</i>	Patógenos de solo	Grânulos solúveis	Natural Industries
Mycostop®	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	<i>Fusarium</i> spp., <i>Alternaria brassicola</i> , <i>Phomopsis</i> spp., <i>Botrytis</i> spp., <i>Pythium</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.	Pó	Kemira Agro

Fonte: modificado de Gardener & Fravel (2002).

**Uso de leveduras saprofiticas.** As leveduras saprofiticas são facilmente encontradas nas superfícies de frutos e folhas de plantas (Hua, 2004). As leveduras, tanto *in vitro* como em condições de armazenamento, podem agir como microrganismos antagônicos diminuindo consideravelmente o crescimento de fungos filamentosos (La Penna *et al.*, 2004). Além disso, algumas dessas leveduras competem exaurindo os nutrientes necessários para a germinação e crescimento de patógenos em pós-colheita, como *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* (Katz *et al.*, 1995; Leibinger *et al.*, 1997; Janisiewicz & Korsten, 2002).

Hua *et al.* (1999) propuseram pela primeira vez o uso de leveduras saprofiticas para o controle de *Aspergillus flavus* e conseqüentemente da aflatoxina. Esses autores desenvolveram um sistema com o mutante *Aspergillus flavus* Papa827. Essa linhagem produz AFB<sub>1</sub> e traços de AFB<sub>2</sub>, mas acumula grande quantidade de ácido norsolorínico (NOR), pigmento laranja-avermelhado facilmente observado na placa de cultivo. Assim, tornou-se possível observar visualmente a interação das leveduras quanto à inibição do crescimento do *Aspergillus flavus* e/ou acúmulo de NOR. Posteriormente, a redução na produção de AF foi estimada por meio de cromatografia líquida (HPLC). De todas as linhagens utilizadas (Tabela 4), a linhagem de *Pichia anomala* WRL-076 foi a que melhor inibiu a síntese de AF. Essa linhagem proporcionou resultados promissores no controle de *Aspergillus flavus* em testes de campo em árvores de pistache (Hua, 2004).

**Tabela 4.** Espécies de leveduras utilizadas por Hua *et al.* (1999) para inibição da síntese de aflatoxina.

Espécie	Linhagem
<i>Candida guilliermondii</i>	WRL-015
<i>Candida kruzei</i>	WRL-038
<i>Candida oleophila</i>	WRL-084
<i>Cryptococcus laurentii</i>	WRL-024
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	WRL-053
<i>Pichia anomala</i>	WRL-076

O uso de leveduras no controle de *Aspergillus* spp. é interessante pois suas linhagens podem ser utilizadas diretamente sobre os grãos em condições de armazenamento (La Penna *et al.*, 2004; La Penna & Etcheverry, 2006). De fato, muitas espécies de levedura são utilizadas diretamente em rações, mas para outros fins. Por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* é usada como um aditivo para rações de ruminantes (Chaucheyras *et al.*, 1996). Recentemente essa espécie de levedura foi relatada como capaz de reduzir a produção de AFB<sub>1</sub> em ração para frango (Kusumaningtyas *et al.*, 2006). Até o momento, não há relato de linhagem comercial de levedura para o controle de fungos produtores de AF.

## Considerações Finais

Os agentes microbianos de controle biológico têm surgido como alternativa mais efetiva do que os diversos fungicidas agrícolas existentes no mercado para o controle de fitopatógenos em pré- e/ou pós-colheita. Por serem considerados mais seguros à saúde humana e ao ambiente, esses agentes atendem à crescente demanda da sociedade para a diminuição do uso de agrotóxicos. Entretanto, no caso de *Aspergillus* spp., poucas metodologias chegaram a sair dos laboratórios. Porém, pelos resultados promissores apresentados nos trabalhos em pré-colheita por meio de linhagens não-aflatoxigênicas e em pós-colheita com o uso de bactérias, actinobactérias e leveduras, é de se esperar grande avanço no controle biológico desses fungos.

Além disso, nos últimos anos tem ocorrido um aumento na procura de novos organismos antagônicos aos fungos produtores de AF, resultando na identificação de novas moléculas bioativas. Esses compostos podem agir bloqueando (completa ou parcialmente) a síntese de AF e/ou impedindo o desenvolvimento do fungo aflatoxigênico. Caso essas substâncias apresentem uma toxicidade relativamente baixa aos seres humanos e animais, poderão ser utilizadas em novas formulações.

A biotecnologia pode se tornar uma ferramenta poderosa no controle de *Aspergillus* spp. diretamente no campo. Aliás, o uso de plantas transgênicas – contendo os genes, principalmente provenientes de bactérias, responsáveis pela produção de quitinase e/ou endoglicanase – tem mostrado resultados promissores para o controle de vários fitopatógenos. Por meio da identificação de bactérias produtoras de enzimas líticas ativas contra fungos aflatoxigênicos, não é de se admirar que em breve essa tecnologia também seja empregada em culturas que possuam problemas com contaminação por AF.

## Referências

- Al-Bari, M.A.A.; Sayeed, M.A.; Khan, A.; Islam, M.B.; Khondokar, P.; Rahman, M.M.S. & Islam, M.A. In vitro antimicrobial activities and cytotoxicity of ethyl acetate extract from *Streptomyces maritimus*. *Biotechnology* 6: 81-85. 2007.



- Araújo, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) *Ecologia microbiana. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPMA*. 1998. pp. 351-367.
- Barnes, S.F.; Dola, T.P.; Bennett, J.W. & Bhatnagar, D. Synthesis of sterigmatocystin on a chemically defined medium by species of *Aspergillus* and *Chaetomium*. *Mycopathologia* 125: 173-178. 1994.
- Bhatnagar, D.; Cary, J.W.; Ehrlich, K.; Yu, J. & Cleveland, T.E. Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia* 162: 155-166. 2006.
- Bintvihok, A.; Ponpornpisit, A.; Tangtrongpiros, J.; Panichkriangkrai, W.; Rattanapanee, R.; Doi, K. & Kumagai, S. Aflatoxin contamination in shrimp feed and effects of aflatoxin addition to feed on shrimp production. *Journal of Food Protection* 66: 882-885. 2003.
- Bottone, E.J. & Peluso, R.W. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against *Mucoraceae* and *Aspergillus* species: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology* 52: 69-74. 2003.
- Brown, R.L.; Cotty, P.J. & Cleveland, T.E. Reduction in aflatoxin content of maize by atoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection* 54: 223-226. 1991.
- Caldas, E.D.; Silva, S.C. & Oliveira, J.N. Aflatoxins and ochratoxin A in food and the risks to human health. *Revista de Saúde Pública* 36: 319-323. 2002.
- CAST (Council for Agricultural Science and Technology). *Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and Human Systems*. Task Force Report no 139. 2003.
- Chaucheyras, F.; Fonty, G.; Bertin, G.; Salmon, J.M. & Gouet, P. Effect of a strain *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell SC1), a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism *in vitro*. *Canadian Journal of Microbiology* 42: 927-933. 1996.
- Chernin, L.; Ismailov, Z.; Haran, S. & Chet, I. Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1720-1726. 1995.
- Clardy, J.; Fischback, M.A. & Walsh, C.T. New antibiotic from bacterial natural products. *Nature Biotechnology* 24: 1541-1550. 2006.
- Cohen-Kupiec, R. & Chet, I. The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 207-277. 1998.
- Cotty, P.J. & Bhatnagar, D. Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains in ability to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxina biosynthetic pathway enzymes. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 2248-2251. 1994.
- Cotty, P.J.; Bayman, D.S.; Egel, D.S. & Elias, K.S. Agriculture, aflatoxins and *Aspergillus*. In: Powell, K. (Ed.) *The genus Aspergillus*. New York. Plenum Press. 1994. pp. 1-27.
- Creppy, E.E. Update of survey, regulation and toxic of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters* 127: 19-29. 2002.
- De Schrijver, A. & De Mot, R. Degradation of pesticides by actinomycetes. *Critical Reviews in Microbiology* 25: 85-119. 1999.
- Diekman, M.A. & Green, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *Journal of Animal Science* 70: 1615-1627. 1992.
- Dorn, B.; Musa, T.; Krebs, H.; Fried, P.M. & Forrer, H.R. Control of late blight in organic potato production: evaluation of copper-free preparations under field, growth chamber and laboratory conditions. *European Journal of Plant Pathology* 119: 217-240. 2007.
- Dorner, J.W. Biological control of aflatoxin contamination of crops. In: Abbas, H.K. (Ed.) *Aflatoxin and food safety*. Boca Raton. CRC Press. 2005. pp. 333-352.
- Dorner, J.W. & Cole, R.J. Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. *Journal of Stored Products Research* 38: 329-339. 2002.
- Dorner, J.W.; Cole, R.J.; Connick, W.J.; Daigle, D.J.; McGuire, M.R. & Shasha, B.S. Evaluation of biological control formulations to reduce aflatoxin contamination in peanuts. *Biological Control* 26: 318-324. 2003.
- Dvorackova, I. *Aflatoxins and Human Health*. Boca Raton. CRC Press. 1990.
- Eaton, D.L. & Gallagher, E.P. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology* 34: 135-172. 1994.
- Filtenborg, O.; Frisvad, J.C. & Thrane, U. Moulds in food spoilage. *Food Microbiology* 33: 85-102. 1996.
- Flannigan, B. Mycotoxins. In: D'Mello, J.P.F.; Duffus, C.M. & Duffus, J.H. (Eds.) *Toxic substances in crop plants*. Cambridge. The Royal Society of Chemistry. 1991. pp. 226-257.

- Gardener, B.B.M. & Fravel, D.R. Biological control of plant pathogens: research, commercialization and application in USA. APSnet. 2002.
- Goldin, B. R. & Gorbach, S. L. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *American Journal of Clinical Nutrition* 39: 756-761. 1984.
- Gomes, R.C.; Sêmedo, L.T.A.S.; Soares, R.M.A.; Linhares, L.F.; Ulhoa, C.J.; Alviano, C.S. & Coelho, R.R.R. Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *Journal of Applied Microbiology* 90: 653-661. 2001.
- Graham, L.S. & Sticklen, M. B. Plant chitinases. *Canadian Journal of Botany* 72: 1057-1083. 1994.
- Guimarães, L.H.S.; Peixoto-Nogueira, S.C.; Michelin, M.; Rizzatti, A.C.S.; Sandrim, V.C.; Zanoelo, F.F.; Aquino, A.C.M.M.; Junior, A.B. & Polizeli, M.L.T.M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 37: 474-480. 2006.
- Haas, D. & Défago, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews in Microbiology* 3: 307-319. 2005
- Haran, S.; Schiekler, H. & Chen, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* 142: 2321-2331. 1996.
- Haskard, C.A.; El-Nezami, H.S.; Kankaanpää, P.E.; Salminen, S. & Ahokas, J.T. Surface binding of aflatoxin B1 by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3086-3091. 2001.
- Heydari, A. & Misaghi, I.J. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. *Plant and Soil* 202: 109-116. 1998.
- Hopwood, K.A. & Sherman, D.H. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual Review of Genetics* 24: 37-66. 1990.
- Hua, S.-S.T.; Baker, J.L. & Flores-Espiritu, M. Interactions of saprophytic yeasts with a nor mutant of *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2738-2740. 1999.
- Hua, S.-S.T. Field assessment of an effective yeast strain to control aflatoxina-producing fungus, *Aspergillus flavus*. Proceedings, IV. California Conference on Biological Control, Berkeley. 2004. pp. 154-157.
- Hussein, H.S. & Brasel, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167: 101-134. 2001.
- Janisiewicz, W. & Korsten, L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review in Phytopathology* 40: 411-441. 2002.
- Katz, H.; Berkovitz, J.; Chalutz, E.; Droby, S.; Hofstein, R. & Keren-Tzoor, M. Compatibility of Ecogen's biofungicide ASPIR™, a yeast based preparation, with other fungicides commonly used for the control of post-harvest decay of citrus. *Phytopathology* 85: 1123. 1995.
- Keller, N.P.; Kantz, N.J. & Adams, T.H. *Aspergillus nidulans* verA is required for production of the mycotoxin sterigmatocystin. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1444-1450. 1994.
- Kimura, N. & Hirano, S. Inhibition strain of *Bacillus subtilis* for grown and aflatoxin-production of aflatoxicogenic fungi. *Agricultural and Biological Chemistry* 52: 1173-1179. 1988.
- Klich, M.A. & Pitt, J.I. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. *Transactions of the British Mycological Society* 91: 99-108. 1988.
- Klich, M.A.; Tiffany, L.H. & Knaphus, G. Ecology of the aspergilli of soils and litter. In: Klich, M.A. & Bennett, J.W. (Eds.) *Aspergillus biology and industrial applications*. Boston. Butterworth-Heinemann. 1994. pp. 329-353.
- Kusumaningtyas, E.; Widiastuti, R. & Maryam, R. Redution of aflatoxina B1 in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mycopathology* 162: 307-311. 2006.
- La Penna, M. & Etchevery, M. Impact on growth and aflatoxin B1 accumulation by *Kluyveromyces* isolates at different water activity conditions. *Mycopathology* 162: 347-353. 2006.
- La Penna, M.; Nesci, A. & Etchevery, M. In vitro studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section *Flavi* by *Kluyveromyces* spp. *Letters in Applied Microbiology* 38: 257-264. 2004.
- Leibinger, W.; Breuker, B.; Hahn, M. & Mendgen, K. Control of postharvest pathogens and colonization of apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* 87: 1103-1110. 1997.

- López, C.E.; Ramos, L.L.; Ramadán, S.S. & Bulacio, L.C. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 14: 31-34. 2003.
- McLean, M. & Dutton, M.F. Cellular interactions and metabolism of aflatoxin: an update. *Pharmacology and Therapeutics* 65: 163-192. 1995.
- Melchers, L.S. & Stuijver, M.H. Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 147-152. 2000.
- Munimbazi, C. & Bullerman, L.B. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. *Mycopathologia* 140: 163-169. 1998.
- Nakashima, N.; Mitani, Y. & Tamura, T. Actinomycetes as host cells for production of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories* 4: 7. 2005.
- Nesci, A.V.; Bluma, R.V. & Etcheverry, M.G. In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus section Flavi* and aflatoxin production. *European Journal of Plant Pathology* 113: 159-171. 2005.
- Oatley, J.T.; Rarick, M.D.; Linz, J.E. & Ji, G.E. Binding of aflatoxin B1 to bifidobacteria in vitro. *Journal of Food Protection* 63: 1133-1136. 2000.
- O'Brian, G.R.; Fakhoury, A.M. & Payne, G.A. Identification of genes differentially expressed during aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Fungal Genetics & Biology* 39: 118-127. 2003.
- Ômura, S. & Crump, A. The life and times of ivermectin a success story. *Nature Reviews in Microbiology* 2: 984-989. 2004.
- Onilude, A.A.; Fagade, O.E.; Bello, M.M. & Fadahunsi, I.F. Inhibition of aflatoxina-producing aspergilli by lactic acid bacteria isolates from indigenously fermented cereal gruels. *African Journal of Biotechnology* 4: 1404-1408. 2005.
- Palmgreen, M.S. & Hayes, A.W. Aflatoxins in foods. In: Krogh, P. (Ed.). *Mycotoxins in food*. London. Academic Press. 1987. pp. 65-96.
- Papp, E.; H-Otta, K.; Zaray, G. & Mincsovcics, E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. *Microchemical Journal* 73: 39-46. 2002.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. *Annual Reviews of Phytopathology* 39: 103-133. 2001
- Raaijmakers, J.M.; Vlami, M. & Souza, J.T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek, Journal of Microbiology* 81: 37-547. 2002.
- Rustom, I.Y.S. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry* 59: 57-67. 1997.
- Sakuda, S.; Ono, M.; Furihata, K.; Nakayama, J.; Suzuki, A. & Isogai, A. Aflastatin A, a novel inhibitor of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus*, from *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society* 118: 7855-7856. 1996.
- Sakuda, S.; Ono, M.; Ikeda, H.; Sakurada, M.; Nakayama, J.; Suzuki, A. & Isogai, A. Aflastatins: new *Streptomyces* metabolites that inhibit aflatoxin biosynthesis. In: Cutler, H.G. & Cutler, S.J. (Eds.) *Biologically active natural products: agrochemicals*. Boca Raton. CRC Press. 1999. pp. 185-199.
- Sakuda, S.; Ono, M.; Ikeda, H.; Nakamura, T.; Inagaki, Y.; Kawachi, R.; Nakayama, J.; Suzuki, A.; Isogai, A. & Nagasawa, H. Blastidicin A as an inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 53: 1265-1271. 2000a.
- Sakuda, S.; Ikeda, H.; Nakamura, T.; Kawachi, R.; Kondo, T.; Ono, M.; Sakurada, M.; Inagaki, H.; Ito, R. & Nagasawa, H. Blastidicin A derivatives with highly specific inhibitory activity toward aflatoxin production in *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Antibiotics (Tokyo)* 53: 1378-1384. 2000b.
- Schisler, D.A.; Slininger, P.J.; Behle, R.W. & Jackson, M.A. Formulation of *Bacillus* spp. For biological control of plant diseases. *Phytopathology* 94: 1267-1271. 2004.
- Scott, P.M.; Lombaert, G.A.; Pellaers, P.; Bacler, S. & Lappi, J. Ergot alkaloids in grain foods sold in Canada. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International* 75: 773-779. 1992.
- Shenasi, M.; Aidoo, K.E. & Candlish, A.A.G. Microflora of date fruits and production of aflatoxins at various stage of maturation. *International Journal of Food Microbiology* 79: 113-119. 2002.
- Sweeney, M.J. & Dobson, A.D.W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters* 175: 49-163. 1999.

- Trail, F.; Mahanti, N. & Linz, J. Molecular biology of aflatoxin biosynthesis. *Microbiology* 141: 755-765. 1995.
- van Wezel, G.P.; Krabben, P.; Traag, B.A.; Keijser, B.J.F.; Kerste, R.; Vijgenboom, E.; Heijnen, J.J. & Kraal, B. Unlocking *Streptomyces* spp. for use as sustainable industrial production platforms by morphological engineering. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 5283-5288. 2006.
- von Bubnoff, A. Seeking new antibiotics in nature's backyard. *Cell* 127: 867-869. 2006.
- Wang, S.L. & Chang, W.T. Purification and characterization of bifunctional chitinases lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 380-386. 1997.
- Wang, J.-S. & Groopman, J.D. DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* 424: 167-181. 1999.
- Watanabe, K. Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Microbiology* 12: 237-241. 2001.
- Whipps, J.M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511. 2001.
- Yadav, V.; Gupta, J.; Mandhan, R.; Chhillar, A.K.; Dabur, R.; Singh, D.D. & Sharma, G.L. Investigation of anti-*Aspergillus* properties of bacterial products. *Letters in Applied Microbiology* 41: 309-314. 2005.
- Yan, P.-S.; Song, Y.; Sakuno, E.; Nakajima, H.; Nakagawa, H. & Yabe, K. Cyclo (L-Leucyl-L-Prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7466-7473. 2004.
- Yoshinari, T.; Akiyama, T.; Nakamura, K.; Kondo, T.; Takahashi, Y.; Muraoka, Y.; Nonomura, Y.; Nagasawa, H. & Sakuda, S. Diocatin A is a strong inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Microbiology* 153: 2774-2780. 2007.
- Zinedine, A.; Faid, M. & Benlemlih, M. In vitro reduction of aflatoxin B1 by strains of lactic acid bacteria isolated from Moroccan Sourdough Bread. *International Journal of Agricultural Biology* 7: 67-70. 2005.
- Zucchi, T.D. Potencial de linhagens de *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus* e *Streptomyces* sp. no controle de fungos aflatoxigênicos em amendoim (*Arachis hypogaea*) e aspectos de biossegurança. Tese de Doutorado. São Paulo SP. Universidade de São Paulo. 2007.
- Zucchi, T.D.; Moraes, L.A.B. & Melo, I.S. *Streptomyces* sp. ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains. *Journal of Applied Microbiology* 105: 2153-2160. 2008.

## Capítulo 6

# Indução de Resistência em Plantas a Patógenos por Elicidores de Natureza Bacteriana

Reginaldo da Silva Romeiro\* & Flávio A. Oliveira Garcia

*Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia 36570-000 Viçosa, MG, Brasil, e-mail: rromeiro@ufv.br. \*Bolsista do CNPq.*

## Introdução

A associação com microrganismos benéficos pode trazer vantagens para plantas, tais como supressão e/ou redução de severidade de doenças, aumento da absorção de nutrientes, fixação de nitrogênio atmosférico e promoção de crescimento (Smith & Goodman, 1999).

É fato bem estudado e estabelecido que plantas possuem uma ampla gama de mecanismos de defesa contra patógenos, mecanismos esses que podem ser ativados por eliciadores bióticos ou abióticos (Hutcheson, 1998; Vallad & Goodman, 2004). Tanto assim que, em Fitopatologia, considera-se imunidade como regra e suscetibilidade como exceção, uma vez que os mecanismos de defesa de plantas costumam ser eficientes.

Respostas de defesa da planta podem ser induzidas por diferentes tipos de microrganismos como vírus (Marte *et al.*, 1993), bactérias (Romeiro & Garcia, 2007), fungos (Meera *et al.*, 1995) e nematóides (Kosaka *et al.*, 2001) e tanto por células vivas e intactas, como por seus extratos e frações (Romeiro *et al.*, 2005a). Também produtos químicos dos mais variados grupos podem atuar como eliciadores de mecanismos de defesa (Oostendorp *et al.*, 2001; Faize *et al.*, 2004). A indução não é a criação de uma resistência onde ela não existe, mas a ativação de mecanismos latentes que passam a se expressar após a exposição da plantas a eliciadores adequados (Van Loon *et al.*, 1998). Quando uma planta é levada ao estado de indução, seja por eliciadores bióticos ou abióticos, não se trata de um caso de imunidade, pois a doença pode acontecer, mas com menos lesões, de menor tamanho e redução na esporulação quando se trata de patógeno fúngico (Sticher *et al.*, 1997).

Bactérias benéficas sejam endófitas, rizobactérias ou residentes de filoplano são importantes por promoverem o controle biológico de enfermidades de plantas. Elas podem ser uma alternativa viável e são intensamente investigadas em todo o mundo, com vistas à redução do uso de agrotóxicos na agricultura. Essas bactérias, agentes de biocontrole, podem atuar por antagonismo direto ou por indução de resistência e, em muitos casos, das duas formas, concomitantemente.

Quando o biocontrole se dá por indução de resistência, ele quase sempre traz consigo duas características altamente desejáveis que são a amplitude de efetividade (proteção concomitante contra múltiplos patógenos) e a sistemicidade. Pesquisadores já perceberam a potencialidade do fenômeno de indução de resistência e seu possível uso como instrumento de controle de doenças. No escopo deste texto, será enfocada apenas a indução de resistência em plantas a patógenos por eliciadores de natureza bacteriana, sejam células vivas, componentes e frações celulares ou substâncias sintetizadas por bactérias e liberadas no ambiente.

## **A Indução de Resistência como Fenômeno Biológico**

Quando plantas são previamente expostas a um eliciador, seus tecidos reagem mais rapidamente e com mais eficiência às tentativas de colonização por um patógeno virulento. Diz-se que a planta foi levada ao estado de indução, estado este denominado por Sticher *et al.* (1997) de “*condicionamento*” ou “*sensibilização*”.

Assume-se que o contato entre o eliciador e os tecidos da planta desencadeia a síntese de substâncias que agem como sinais bioquímicos (Thatcher *et al.*, 2005; Becker & Spoel, 2006). Esses sinais se difundem por toda a planta, sistemicamente ou induzindo sua síntese em cadeia, num processo de autogenia. Genes de resistência até o momento inativos são ativados e se expressam para a síntese dos componentes de resistência (Van Loon *et al.*, 1998).

Os indutores de resistência em plantas a patógenos podem ser bióticos ou abióticos. Assim, podem ser compostos químicos, extratos de células de microrganismos, filtrados de culturas ou microrganismos vivos.

## **SAR e ISR – Comentários e Implicações**

Plantas expostas a um agente indutor respondem mais rapidamente a infecção por um fitopatógeno, devido ao condicionamento dado pelo agente eliciador ou indutor (Sticher *et al.*, 1997). Assume-se que o contato entre o eliciador e os tecidos da planta desencadeia a síntese de substâncias que agem como sinais bioquímicos, difundindo-se pela planta e ativando os genes de resistência até então inativos.

Resistência Sistêmica Adquirida (SAR - “*Systemic Acquired Resistance*”) e Resistência Sistêmica Induzida (ISR - “*Induced Systemic Resistance*”) são fenômenos distintos (Sticher *et al.*, 1997), mas fenotipicamente semelhantes, no sentido em que as plantas, após exposição a um agente indutor, têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada.

Para autoridades mundialmente reconhecidas na área de indução de resistência em plantas parece ser consensual que SAR e ISR são fenômenos distintos quanto à forma por meio da qual são induzidos e desencadeados e governados por mecanismos bioquímicos diferentes, mas bastante semelhantes no que concerne ao resultado fenotípico final que se expressa sob forma de indução de resistência, com caráter de sistemicidade. Na Tabela 1 são sumarizadas as diferenças básicas entre SAR e ISR.

**Tabela 1.** Informações compiladas de trabalhos de vários autores sumarizando as diferenças básicas entre Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e Resistência Sistêmica Induzida (ISR). Adaptado de Romeiro (2002).

<b>Critério</b>	<b>SAR</b>	<b>ISR</b>
Acúmulo de PRPs (Proteínas Relacionadas com patogênese)	Sim	Não
Rota de sinalização	Salicilato, principalmente	Etileno e Jasminatos
Alterações visuais na planta	Sim	Não
Elicidor (es)	Patógenos e produtos químicos	Não patógenos
Amplitude da indução	Parcial	Generalizada

Assim, tem-se assumido que SAR envolve o acúmulo de Proteínas Relacionadas com Patogênese (PRPs) como mecanismo de defesa da planta, sua indução é salicilato dependente, pode resultar em alterações visuais (necroses, por exemplo) e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos. No caso de ISR, não há acúmulo de PRPs, a planta que sofreu indução não exhibe alterações, o agente eliciador é usualmente um microrganismo não-patogênico e o fenômeno não é salicilato dependente, parecendo haver outra rota de sinalização associada a jasminatos e etileno.

## **Bactérias Benéficas e Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**

Acreditava-se que o controle biológico promovido por bactérias era devido apenas a mecanismos diretos de antagonismo contra patógenos, como antibiose, competição por nutrientes, competição por nichos ecológicos, produção de sideróforos, predação e parasitismo, produção de enzimas, compostos voláteis inibitórios e interferência com fenômenos de *quorum sensing*, dentre outros. Contudo, em muitos casos, apenas antagonismo direto não explica o controle observado, como por exemplo, em situações que envolvem uma separação espacial entre os componentes microbianos da interação. Um exemplo clássico são as rizobactérias benéficas (PGPR) que, dispensadas na rizosfera, promovem redução na severidade de enfermidades da parte aérea.

Certas bactérias benéficas, quando dispensadas em plantas, são capazes de promover o controle de enfermidades, como rizobactérias, bactérias endofitas e bactérias residentes de filoplano. Sabe-se também que o controle biológico observado pode dar-se por antagonismo direto, por indução de resistência ou por ambos os mecanismos, concomitantemente.

## Resistência Observada e Resistência Induzida

Em casos de indução de resistência, a exposição de plantas a eliciadores, sejam eles bióticos ou abióticos, acarreta uma resposta imediata dos tecidos que reagem mais eficientemente às tentativas de colonização pelo patógeno. Este estado de indução, em termos laboratoriais e de pesquisa, pode ser detectado de várias formas. A forma mais simples é inocular plantas expostas e não expostas ao eliciador e quantificar intensidade de doença. Entretanto, inferências sobre a ocorrência verdadeiramente de indução de resistência precisam ser aceitas “*cum grano salis*”. Muitas vezes, plantas expostas a presumidos eliciadores de resistência exibem menos doença que as não expostas, quando inoculadas com um patógeno desafiante, mas o que se observa pode ser atribuível a outros fatores como escape, inoculações realizadas de forma incorreta e variações nas condições do ambiente entre outros.

Existem critérios passíveis de serem utilizados para se detectar a ocorrência de indução de resistência, como a restrição dos tecidos do hospedeiro à multiplicação do patógeno, o aumento da atividade de enzimas ditas indicadoras do estado de indução e, também e de modo mais específico, o caráter de sistemicidade da resistência observada. Steiner & Schönbeck (1995) idealizaram critérios específicos, denominados “Critérios de Steiner & Schönbeck” que são: ausência de efeitos tóxicos do eliciador sobre o patógeno desafiante; supressão da resistência induzida por substâncias que inibem a expressão de genes do hospedeiro; existência de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência; ausência de uma relação entre magnitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado; inespecificidade da proteção; resistência com característica local e sistêmica e a resistência observada ser dependente do genótipo da planta.

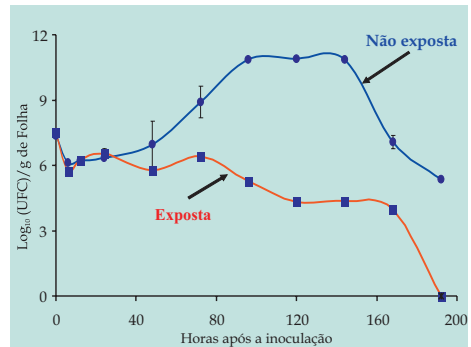
## Critérios para se Detectar a Indução de Resistência

**Restrição à Multiplicação do Patógeno.** Quando uma planta, depois de exposta a um eliciador apropriado, é levada ao chamado estado de indução, patógenos têm mais dificuldade em se multiplicar em seus tecidos e esta é uma das características da resistência induzida. Assim, de acordo com o relato de Klement *et al.* (1966), a infiltração de células da bactéria saprófita *Pseudomonas fluorescens*, tanto vivas como mortas por calor, em folhas de fumo, induziu resistência a *Tobacco mosaic virus* (TMV), inibindo a multiplicação do vírus e a formação de lesões locais.



A harpina de *Erwinia amylovora* induz SAR e patógenos encontram dificuldade em se multiplicar nos tecidos de plantas expostas previamente a ela. Conforme dados da Eden Bioscience (2007), desenvolvedora do bioproduto comercializado com o nome de Messenger®, plantas de *Arabidopsis thaliana* foram atomizadas com a harpina e, após 24 h, as folhas foram imersas em suspensão de células ( $10^8$  UFC/ml) do patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomatoe* em água (controle). A diferentes intervalos de tempo após a inoculação, estimou-se a população do patógeno nas folhas, encontrando-se resistência da planta previamente exposta à harpina à multiplicação do patógeno em seus tecidos.

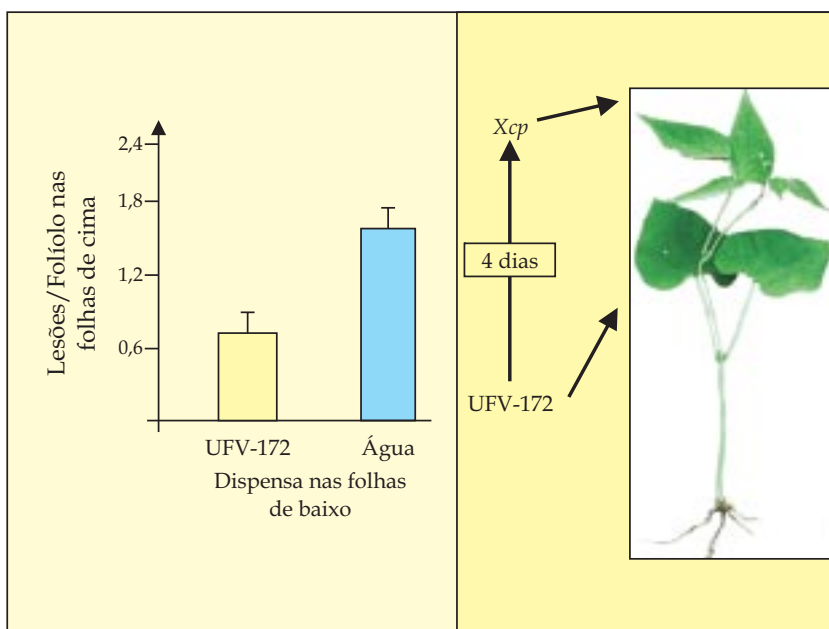
Romeiro *et al.* (2005a) encontraram, em um universo de 500 residentes de filoplano obtidos de plantas saudáveis de feijoeiro, um isolamento de *Bacillus cereus* (UFV-172) que promovia o biocontrole de múltiplas enfermidades fúngicas e bacterianas da cultura, embora não exercesse antagonismo direto contra os patógenos incitantes dessas enfermidades. Isto levou os autores a suspeitarem que o biocontrole pudesse ser devido à indução de resistência. Por meio de antibiogramas, foram encontrados três antibióticos (Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina) aos quais UFV-172 foi sensível, mas *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* foi resistente. Assim, a adição desses antibióticos ao meio 523 de Kado & Heskett (1970) permitiu criar um meio semi-seletivo de cultura onde o patógeno crescia normalmente, mas não o agente de biocontrole e que, provavelmente, era também inibitório para a microbiota não patogênica porventura existente na superfície das folhas de feijoeiro. Em ambiente de casa de vegetação o agente de biocontrole foi dispensado por atomização ( $OD_{540nm} = 0,4$ ) em folhas primárias de plantas jovens de feijoeiro e, após quatro dias, suspensão de células do patógeno foi inoculada por infiltração ( $OD_{540nm} = 0,05$ ), em folhas primárias, com auxílio de seringa hipodérmica. A diferentes intervalos de tempo após a inoculação, discos de folha foram removidos, pesados, triturados em solução fosfato tampão contendo polivinilpirrolidina a 1% e o extrato resultante sofreu diluição seriada seguindo-se semeio em placas. A contagem de UFC/g de tecido permitiu detectar uma nítida diferença entre as tendências populacionais de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em folhas expostas e não expostas ao isolamento UFV-172 (Figura 1). Isso foi interpretado como uma situação de resistência induzida, uma vez que tecidos da planta previamente exposta a propágulos vivos de UFV-172 restringiam a multiplicação do patógeno.



**Figura 1.** Esquerda: folhas primárias de feijoeiro inoculadas por infiltração de uma suspensão de células de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* ( $OD_{540nm} = 0,05$ ). Direita: tendências populacionais do patógeno em folhas de feijoeiro previamente expostas (■—■) e não expostas (●—●) ao residente de filoplano UFV-172 (*Bacillus cereus*).

**Sistemicidade.** Genericamente, considerando-se que é possível obter o biocontrole de enfermidades da parte aérea de plantas advindas de sementes microbiolizadas com uma rizobactéria, presume-se que está acontecendo algum tipo de indução de resistência com caráter de sistemicidade, considerada a separação espacial entre os componentes microbianos da interação (Van Loon *et al.*, 1998). Inclusive, na maioria das vezes, a indução de resistência por agentes microbianos tem caráter de sistemicidade (Steiner & Schönbeck, 1995; Sticher *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998). Ainda assim, experimentos confirmatórios podem ser delineados e realizados para tal fim.

Vieira Júnior (2005), trabalhando com residentes de filoplano e feijoeiro, constatou que o isolamento UFV-172 de *Bacillus cereus*, quando dispensado por atomização, reduzia a severidade do crestamento bacteriano em folhas que não tiveram contato direto com o antagonista, numa clara indicação de sistemicidade. O agente de biocontrole foi dispensado por atomização em folhas baixas, as quais foram imediatamente envoltas em sacos plásticos e, quatro dias após, foram removidas e o patógeno desafiante inoculado nas folhas do terço superior da planta. Procedeu-se a quantificação de doença quando do aparecimento de sintomas (Figura 2). Paralelamente, o reverso deste ensaio foi realizado, com dispensa do agente UFV-172 nas folhas do terço superior e inoculação das do terço inferior. Nos dois casos, observou-se ocorrência de sistemicidade.



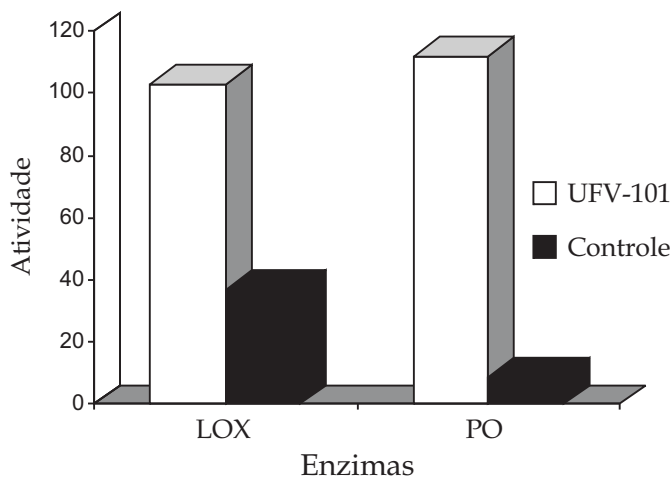
**Figura 2.** Sistemicidade da resposta de resistência de folhas superiores de feijoeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* decorrente da dispensa do residente de filoplano UFV-172 (*Bacillus cereus*) nas folhas baixas. Adaptado de (Romeiro *et al.*, 2005).

**Enzimas Indicadoras do Estado de Indução.** Sabe-se que uma grande variedade de enzimas está relacionada com a resistência induzida, tais como peroxidases, polifenoloxidasas, fenilalanina amônia-liases, lipoxigenases,  $\beta$ -1,3-glucanases e quitinases (Leon-Kloosterziel *et al.*, 2005). Quando a planta é levada ao estado de indução, a atividade dessas enzimas ou, pelo menos de algumas delas, tende a aumentar em relação às atividades em tecidos de plantas não expostas a eliciadores. Quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, por exemplo, que são PRPs, degradam a parede celular de patógenos liberando moléculas que agem como eliciadoras, nas etapas iniciais do processo de indução de resistência (Van Loon *et al.*, 1994). Peroxidases (PO) têm afinidade por substratos envolvidos na lignificação celular e, além disso, seus produtos têm atividade antimicrobiana direta na presença de peróxido de hidrogênio (Sticher *et al.*, 1997) ao passo que fenilalanina-amônia-liases (PAL) também gera precursores para a biossíntese de lignina e de outros compostos fenólicos que se acumulam em resposta à infecção (Klessig & Malamy, 1994). Polifenoloxidasas (PPO) têm a propriedade de oxidar compostos fenólicos a quinonas, as quais geralmente são mais tóxicos aos microrganismos que os compostos fenólicos originais (Sticher *et al.*, 1997) e os produtos da ação de lipoxigenases (LOX) contribuem para as reações de defesa inibindo o crescimento do patógeno, induzindo fitoalexinas e participando também na transdução de sinais (Namai *et al.*, 1990).

Silva *et al.* (2004a) encontraram um isolamento de *Bacillus cereus* (UFV-101) promissor como agente de biocontrole de enfermidades do tomateiro tanto em casa-de-vegetação como em campo. Dentre as evidências de que UFV-101 atua como agente de biocontrole por indução de resistência destaca-se o estudo sobre as alterações na atividade de enzimas indicadoras do estado de indução em plantas expostas e não expostas a células vivas de *Bacillus cereus* (UFV-101). Os autores relatam que não foi detectado aumento nos níveis de  $\beta$ -1,3-glucanase e quitinase nos tecidos de plantas oriundas de sementes microbiolizadas com a rizobactéria. Porém, detectou-se aumento na atividade de PO e LOX nos extratos foliares (Figura 3). Assim, há evidências suficientes para se afirmar que o aumento de resistência a patógenos em plantas de tomateiro oriundas de sementes microbiolizadas com propágulos do isolamento UFV-101 pode ser explicado por indução de resistência.

**Crítérios de Steiner & Schönbeck.** Steiner & Schönbeck (1995) propuseram critérios básicos para investigar se a resistência exibida pela planta foi realmente induzida ou se ela se deve a outros fatores que, de alguma forma, contribuíram para reduzir a incidência e/ou severidade da doença.

**Ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante.** Se o agente indutor tem efeito deletério sobre o patógeno e não há separação espacial entre eles, fica difícil falar em indução de resistência utilizando apenas esse critério. Em contraposição, não se detectando atividade ou efeitos tóxicos do indutor de *per sí* ou de substâncias por ele produzidas contra o patógeno, o fato pode indicar haver indícios de indução de resistência.

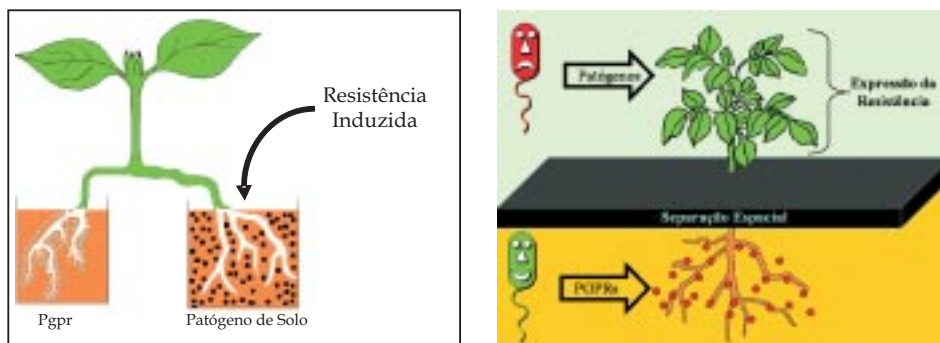


**Figura 3.** Alterações nas atividades de LOX (lipoxigenases, mM de produto formado/min/mg proteína) e PO (peroxidases, nmol de produto formado x10/min/mg proteína) em tecidos foliares de plantas de tomateiro originárias de sementes microbiolizadas com propágulos da PGPR *Bacillus cereus* e inoculadas com o desafiante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. O controle são plantas originárias de sementes não microbiolizadas. Adaptado de Silva *et al.* (2004a).

Em certos casos, é natural a compartimentalização ou separação espacial entre o local em que se aplica o agente de indução e o sítio de inoculação do patógeno desafiante, como nas situações em que o agente de indução é uma rizobactéria aplicada no sistema radicular e o patógeno desafiante é inoculado no filoplano (Figura 4B). Por outro lado, se tanto a rizobactéria como o patógeno estão na rizosfera, fica impossível a separação espacial, a não ser pelo uso de procedimentos específicos, como fender o sistema radicular expondo uma metade dele ao indutor e outra ao desafiante, por uma técnica denominada fendilhamento de raízes (“*split root system*”), conforme Figura 4A. He *et al.* (2002) utilizaram esta técnica de fendilhamento de raízes para demonstrar a habilidade de isolamentos não patogênicos de *Fusarium oxysporum* em induzir resistência em aspargo a isolamentos patogênicos do mesmo patógeno e Ongena *et al.* (2000) detectaram a capacidade da rizobactéria *Pseudomonas putida* (isolamento BTP1) em proteger plantas de pepino contra podridões incitadas por *Pythium aphanidermatum*, pelo uso do mesmo procedimento.

Ainda assim, o agente indutor pode ter efeito deletério sobre o patógeno mesmo havendo separação espacial entre eles. Não se pode descartar a hipótese de um indutor abiótico ser absorvido pela planta e nela se deslocar até onde está o patógeno ou substâncias antimicrobianas produzidas pelo indutor biótico poderem fazer o mesmo. Adicionalmente, não se pode descartar a possibilidade do indutor atuar de outras formas. Se for um indutor abiótico, mesmo não atuando diretamente sobre o patógeno, ele pode atuar sobre a microbiota presente no sítio de inoculação ou ser absorvido e se translocar na planta até o sítio de inoculação, favorecendo a predominância daqueles microrganismos que são naturalmente antagônicos ao patógeno. Se for um indutor biótico, uma rizobactéria por exemplo, outros mecanismos de antagonismo podem estar atuando sem ser a produção de

substâncias antimicrobianas. Por esta e por muitas outras razões, não se deve utilizar apenas um critério para verificação da natureza da resistência observada. No caso do acyl-bezolar-S-Methyl (ASM), um reconhecido indutor de resistência em plantas a patógenos, verificou-se insensibilidade a ele por vários patógenos do tomateiro e feijoeiro (Tabela 2) (Jesus Jr *et al.*, 1999; Romeiro, 1999; Rodrigues *et al.*, 2000).



**Figura 4.** Separação espacial entre PGPRs (Rizobactérias Promotoras de Crescimento das Plantas) e agente de biocontrole. (A) = “split root system”, para o caso de patógenos de solo. (B), no caso de PGPRs e patógenos de parte aérea. Adaptado de Romeiro (2007).

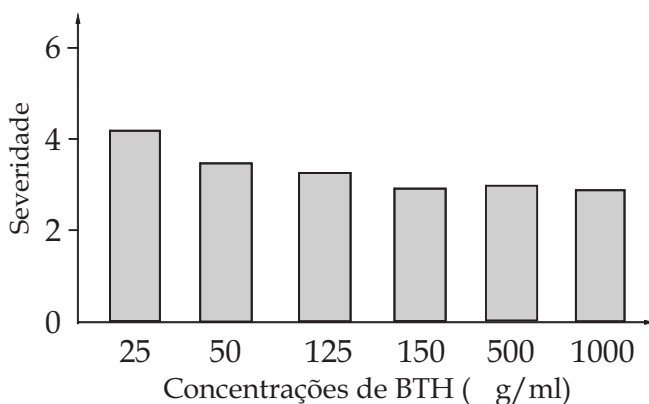
**Tabela 2.** Insensibilidade de patógenos fúngicos e bacterianos, de feijoeiro e de tomateiro derivado benzotiadiazólico (acyl-bezolar-S-Methyl -ABS) em concentrações variando de 10 a 500mg/ml, quando comparado com antibióticos de largo espectro e com o antifúngico cicloheximida. Baseado em informações de Jesus Jr *et al.* (1999); Romeiro (1999) e Rodrigues *et al.* (2000).

Patógeno	Tipo de teste	Antibiótico	Antifúngico	ABS
<i>Alternaria solani</i>	Inibição de micélio	-	+	-
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	Difusão em ágar	+	-	-
<i>Corynespora cassiicola</i>	Inibição de micélio	-	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Difusão em ágar	+	-	-
<i>Phaeoisariopsis griseola</i>	Inibição de micélio	-	+	-
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	Difusão em ágar	+	-	-
<i>Uromyces appendiculatus</i>	Inibição de germinação	+	+	-

***Supressão da resistência induzida pela exposição prévia da planta a substâncias que inibem a expressão de genes do hospedeiro, como a actinomicina D.***  
A premissa é que, se a resistência induzida é codificada por genes do hospedeiro que precisam ser ativados para que ela se expresse e se o bloqueio desses genes não afetam a resistência, então ela não foi induzida e se deve a outras causas. Van Loon *et al.* (1998) consideram esse critério como sendo de difícil implementação. Primeiro, porque actinomicina D afeta muitos processos da planta e, segundo, por ter ação também sobre muitos microrganismos.

**Necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência.** Há necessidade de algum tempo para que a planta atinja aquilo que Sticher *et al.* (1997) denominam de estado de indução, posto que a expressão dos genes ativados não é, obviamente, imediata, sendo que pode demorar de alguns dias a uma semana para expressão, pela planta, de SAR ou ISR (Hammerschmidt, 1999). Leeman *et al.* (1995) relataram que a indução de resistência à murcha de *Fusarium* em rabanete pelo uso de *Pseudomonas fluorescens* como a PGPR indutora demorou pelo menos um dia. Assim, se a redução de incidência e/ou severidade, for imediata, outros mecanismos e/ou fatores podem ser os responsáveis.

**Ausência de uma relação entre magnitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado, à semelhança do que se observa em casos típicos de uso de agrotóxicos.** Na opinião de Sticher *et al.* (1997), assim como de Van Loon *et al.* (1998), se o indutor é biótico, há necessidade de uma quantidade mínima de células em contato com a planta para haver indução mas, uma vez expressada essa resistência, aumentos da quantidade de células do indutor não correspondem a um aumento da resistência. No caso de indutores abióticos, o mesmo se aplica. Rodrigues *et al.* (2000), trabalhando com derivado benzotiadiazólico (acyl-bezolar-S-Methyl -ABS) e indução de resistência a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em feijoeiro, também confirmaram a validade deste critério (Figura 5).



**Figura 5.** Ausência de aumento de resposta de resistência de feijoeiro a *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* pela aplicação de doses crescentes de derivado benzotiadiazólico (acyl-bezolar-S-Methyl -ABS). Adaptado de Rodrigues *et al.* (2000).

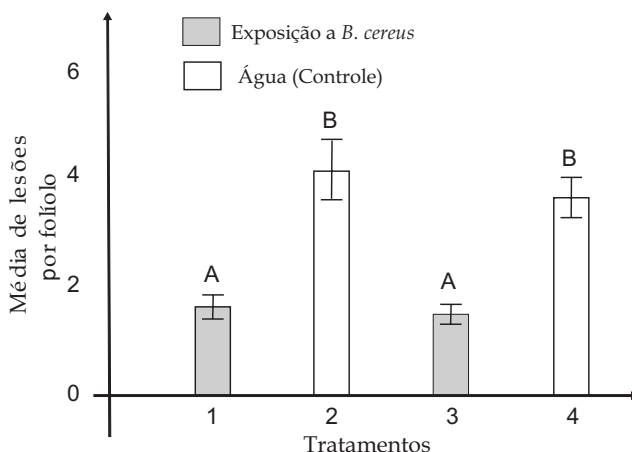
**Inespecificidade da proteção.** Diversos autores comentam que, quando acontece verdadeira indução de resistência, principalmente no caso de indutores bióticos, há uma proteção generalizada contra uma ampla gama de patógenos (Kloepper *et al.*, 1999; Tuzun, 2001). Assim, Hoffland *et al.* (1997) comentam que resistência sistêmica induzida em rabanete por *Pseudomonas fluorescens* (WCS417) mostrou-se efetiva contra murcha de *Fusarium* e contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Também Silva *et al.* (2004b) selecionaram uma rizobactéria (isolamento UFV-101 de *Bacillus cereus*) com propriedades de PGPR e capaz de proteger plantas de tomateiro, via microbiolização de sementes, contra múltiplos patógenos da parte aérea (Tabela 3).

**Tabela 3.** Indução de resistência múltipla em tomateiro a vários patógenos pela rizobactéria UFV-101 (*Bacillus cereus*) e ausência de antibiose direta contra todos eles. Adaptado de Silva *et al.* (2004b).

Patógeno desafiante	Lesões/Foliolo		Antibiose <i>in vitro</i>
	UFV-101	Controle	
<i>Alternaria solani</i>	0,74	2,19	Ausência
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	2,03	3,14	Ausência
<i>Oidium</i> sp.	0,98	2,88	Ausência
<i>Stemphylium solani</i>	1,13	2,58	Ausência
<i>Cercospora cassiicola</i>	2,12	3,40	Ausência
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	1,32	4,55	Ausência

**A resistência deve ser local e sistêmica.** Na concepção de vários autores (Sticher *et al.*, 1997; Van Loon *et al.*, 1998), a resistência induzida não tem, necessariamente, que ser sistêmica. Mas em muitos casos há sistemicidade. Tanto no caso de SAR como de ISR, um sinal é gerado no sítio de contato entre o eliciador e o órgão vegetal, sinal esse que se transloca para outros órgãos, desencadeando eventos que culminam com a ativação de genes de resistência (Van Loon *et al.*, 1998). Um dos problemas é a possibilidade do presumido indutor biótico atuar por antibiose direta conduzindo à errônea conclusão que houve indução.

Neves (2005), trabalhando com a rizobactéria UFV-101 (*Bacillus cereus*), previamente selecionada como agente de biocontrole de doenças do tomateiro e indutora de resistência (Silva *et al.*, 2004ab), encontrou resultados semelhantes. Para tanto, a autora dispensou a rizobactéria por atomização nas folhas do terço superior e inoculou as folhas do terço inferior com o patógeno desafiante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. A forma inversa de inoculação também foi realizada. Nos dois casos foram observados a sistemicidade de proteção (Figura 6).



**Figura 6.** Indução de resistência com caráter de sistemicidade por UFV-101 (*Bacillus cereus*) em plantas de tomateiro como demonstrado pela posterior (4 dias) inoculação com o desafiante *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, em que: 1 – dispensa de *Bacillus cereus* nas folhas de cima e inoculação do patógeno nas folhas de baixo. 2 – atomização com água nas folhas de cima e inoculação do patógeno nas folhas de baixo. 3 – inverso do tratamento 1. 4 - inverso do tratamento 2. Adaptado de Neves (2005).

**Resistência observada dependente do genótipo da planta.** Esse é um ponto tratado com ênfase por Van Loon et al. (1998), que postula de forma lógica que, se não há genes de resistência a serem ativados, é impossível induzir resistência em uma planta pela exposição a um eliciador, seja ele biótico ou abiótico. As rizobactérias *Pseudomonas putida* e *Serratia marcescens* foram testadas por Liu et al. (1995) como indutoras de resistência em quatro variedades de pepino, sendo três suscetíveis e uma resistente. *P. putida* induziu resistência nas três cultivares suscetíveis, mas *Serratia marcescens* em apenas duas. Porém, ambas rizobactérias não induziram aumento da resistência na cultivar resistente. Como todas colonizaram com eficiência o sistema radicular das cultivares em teste, uma colonização deficiente não explicaria os resultados.

## **Considerações Finais - Indução de Resistência e Perspectivas para o Futuro**

O desenvolvimento de metodologias de aplicação prática para o controle biológico de enfermidades de plantas é uma necessidade premente da sociedade moderna. No caso de muitas plantas de valor econômico, torna-se praticamente impossível seu cultivo sem o uso de agrotóxicos. São pulverizações rotineiras, às vezes diárias, utilizando-se um coquetel preparado pela mistura de vários produtos. Em muitas instâncias, esses produtos e suas dosagens são escolhidos pelo próprio agricultor, de forma mais ou menos empírica, sem qualquer harmonia com as normas mais elementares dos receituários agrônômicos. As consequências são, no mínimo, catastróficas. Primeiramente, nunca se consegue um controle efetivo, o que acaba levando o agricultor a aumentar indiscriminadamente as dosagens, a frequência de aplicações e o número de componentes no coquetel, em vãs tentativas de otimizá-lo. A produtividade, devido à ocorrência de múltiplas enfermidades, assim controladas em caráter precaríssimo, acaba sendo baixa.

O uso institucionalizado, sistemático, abusivo e em grandes quantidades, de múltiplos agrotóxicos terminam por agredir o ambiente e a comprometer a integridade de ecossistemas, com consequências imprevisíveis a médio e longo prazo. A quantidade de resíduos nos órgãos vegetais comercializados é alta e preocupante, no que tange à saúde humana. O custo de produção torna-se elevado, devido às numerosas pulverizações e também face à enorme quantidade de fertilizante gasta para fazer uma planta, doente e intoxicada, produzir um mínimo aceitável.

Em seu livro sobre patogênese em plantas e controle de enfermidades, Oku (1994) enfoca com ênfase e realismo, problemas fitopatológicos dos tempos modernos que são as agressões ao ambiente e os danos à saúde decorrentes do uso indiscriminado de agrotóxicos. O autor dedica um capítulo ao uso de resistência sistêmica induzida como instrumento inteligente de controle.

Ao se aproximar o Terceiro Milênio, há mister investigar, com seriedade e persistência, métodos alternativos para o controle de enfermidades de plantas que



sejam, ao mesmo tempo, eficientes e menos agressivos à saúde e ao ambiente. Encontrar uma forma, a mais inócua possível, de ativar os mecanismos de defesa da planta deixando que ela própria se proteja contra patógenos, ao invés de saturá-la e intoxicá-la com agrotóxicos, por certo é uma estratégia correta.

Como palavra final, vale comentar o que relatam Chen *et al.* (1996) sobre a experiência chinesa, desde a década de 60 até os dias atuais, com o uso rotineiro de rizobactérias como ativadoras de defesas e como promotoras de crescimento de plantas. A microbiolização de sementes, antes do plantio, com propágulos de rizobactérias, tem sido prática agrônômica rotineira na China Continental onde o governo encarrega-se de distribuir aos agricultores 3.000 toneladas de formulações de células de rizobactérias todos os anos, para serem utilizadas em 35.000.000 ha de plantio. Talvez por razões políticas que motivaram o isolamento da República Popular da China em todos os níveis, de intercâmbio científico inclusive, talvez pela própria filosofia de pesquisa e de enfoque de problemas, somente há algum tempo o mundo ocidental tem tomado conhecimento e percebido a incomensurável potencialidade do desenvolvimento de tecnologias específicas para o biocontrole de doenças de plantas como alternativa inteligente ao uso indiscriminado de agrotóxicos.

## Referências

- Beckers, G.J.M. & Spoel, H.S. Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* 8: 1-10. 2006.
- Chen, Y.; Mei, R.; Liu, L. & Kloepper, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: Utkhede, R.S. & Gupta, V. K (Eds.) *Management of Soil Born Diseases*. Ludhiana. Kalyani Publishers. 1996. pp. 165-184. Eden Bioscience. Disponível em: <http://www.edenbio.com>. Acesso em: 15 out. 2007.
- Faize, M.; Faize, L.; Koike, N.; Ishizaka, M. & Ishii, H. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense responses. *Phytopathology* 94: 604-612. 2004.
- Hammerschmidt, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 77-84. 1999.
- He, C.Y.; Hsiang, T. & Wolyn, D.J. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 51: 225-230. 2002.
- Hoffland, E.; Bakker, P. & Van Loon, L.C. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance-reply. *Phytopathology* 87: 138. 1997.
- Hutcheson, S.W. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review of Phytopathology* 36: 59-90. 1998.
- Jesus Jr., W. C.; Romeiro, R.S.; Rodrigues, F.A. & Pereira, J.L.A. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 24: 293. 1999.
- Kado, C. I. & Heskett, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-979. 1970.
- Klement, Z.; Király, Z. & Pozsar, R. Suppression of virus multiplication and local lesion production in tobacco following inoculation with a saprophyte bacterium. *Acta Phytopathologica Hungariae* 1: 11-18. 1966.
- Klessig, D. F. & Malamy, J. The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology* 26: 1439-1458. 1994.
- Kloepper, J.W.; Rodriguez, K.R.; Zehnder, G.W.; Murphy, J.F.; Sikora, E. & Fernandez, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28: 21-26. 1999.

- Kosaka, H.; Aikawa, T.; Ogura, N.; Tabata, K. & Kiyohara, T. Pine wilt disease caused by the pine wood nematode: The induced resistance of pine trees by the avirulent isolates of nematode. *European Journal of Plant Pathology* 107: 667-675. 2001.
- Leeman, M.; Vanpelt, J.A.; Denouden, F.M.; Heinsbroek, M.; Bakkr, P.A.H.M. & Schippers, B. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium-wilt, using a novel bioassay. *European Journal of Plant Pathology* 101: 655-664. 1995.
- Leon-Lloosterziel, K.M.; Verhagen, B.W.M.; Keurentjes, J.J.B.; Vanpelt, J.A.; Rep, M.; Van Loon, L.C. & Pieterse, C.M.J. Colonization of the Arabidopsis rhizosphere by fluorescent *Pseudomonas* spp. activates a root-specific, ethylene-responsive PR-5 gene in the vascular bundle. *Plant Molecular Biology* 57: 731-748. 2005.
- Liu, L.; Klopper, J.W. & Tuzun, S. Induction of systemic resistance in cucumber against fusarium-wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85: 695-698. 1995.
- Marte, M.; Buonauro, R.; Torre, G. & Della Torre, G. Induction of systemic resistance to tobacco powdery mildew by tobacco mosaic virus, tobacco necrosis virus or ethephon. *Journal of Phytopathology* 138: 137-144. 1993.
- Meera, M.S.; Shivanna, M.B.; Kageyama, K. & Hyakumachi, M. Persistence of induced systemic resistance in cucumber in relation to root colonization by plant-growth promoting fungal isolates. *Crop Protection* 14: 123-130. 1995.
- Namai, T.; Kato, T.; Yamaguchi, Y. & Togashi, J. Time-course alteration of lipoxygenase activity in blast-infected rice leaves. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 56: 26-32. 1990.
- Neves, D. M. S. Biocaracterização de um isolado de *Bacillus cereus* selecionado para o controle biológico de enfermidades do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). (Tese de Doutorado). Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- Oku, H. *Plant Pathogenesis and Disease Control*. Boca Raton. Lewis Publishers. 1994.
- Ongena, M.; Daayf, F.; Jacques, P.; Thonart, P.; Benhamou, N.; Paulitz, T.C. & Belanger, R.R. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads. *Plant Pathology* 49: 523-530. 2000.
- Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B. & Staub, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107: 19-28. 2001.
- Rodrigues, F.A.; Jesus Jr., W.C. & Romeiro, R.S. Um derivado benzotriazolico como ativador químico de mecanismos de defesa do feijoeiro à ferrugem. *Summa Phytopathologica* 26:76. 2000.
- Romeiro, R.S. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. Viçosa. Editora UFV. 1999.
- Romeiro, R.S. ISR-SAR: Pesquisa com procariotas para indução de resistência em plantas a patógenos, na Universidade Fderal de Viçosa. Anais, I. Simpósio de Biologia Molecular da Resistência de Plantas a Patógenos: aplicações no manejo integrado de fitodoeças. Lavras, MG. 2002. pp. 87-119.
- Romeiro, R.S. *Controle Biológico de Doenças de Plantas - Fundamentos*. Viçosa. Editora UFV. 2007.
- Romeiro, R.S. & Garcia, F.A.O. Metabólitos e constituintes bacterianos como indutores de resistência em plantas a patógenos. In: Romeiro, R.S. & Rodrigues, F.A. (Eds.) *Indução de Resistência em Plantas a Patógenos*. Rio Branco. Suprema Gráfica e Editora Ltda. 2007. pp. 131-160.
- Romeiro, R. S.; Vieira Júnior, J.R.; Silva, H.S.A.; Baracat-Pereira, M.C. & Carvalho, M.G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Phytopathology* 153: 120-123. 2005a.
- Romeiro, R.S.; Vieira Júnior, J.R.; Ferraz, H.G.M.; Barra, V.R.S. & Melo, I.S. A biocontrol agent for bacterial blight that induces systemic resistance as it restrains pathogen multiplication in bean leaf tissue. *Proceedings, 1<sup>st</sup> International Symposium on Biocontrol of Bacterial Plant Diseases*. Darmstadt, Alemanha. 2005b. pp. 1-6.
- Silva, H.S.A.; Romeiro, R.S.; Carrer Filho, R.; Pereira, J.L.A.; Mizubuti, E.S.G. & Mounteer, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. *Journal of Phytopathology* 152: 371-375. 2004a.
- Silva, H.S.A.; Romeiro, R.S.; Macagnan, D.; Halfeld-Vieira, B.A.; Baracat-Pereira, M.C. & Mounteer, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control* 29: 288-295. 2004b.

- Smith, K. P. & Goodman, R.M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. *Annual Review of Phytopathology* 37: 473-491. 1999.
- Steiner, U. & Schonbeck, F. Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt, R. & Kuc, J. (Eds.) *Induced Resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology, v. 4)*. Dordrecht. Kluwer Academic Pub. 1995. pp. 86-110.
- Sticher, L.; Mauch Mani, B. & Metraux, J.P. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270. 1997.
- Thatcher, L.F.; Anderson, J.P. & Singh, K.B. Plant defence responses: what have we learnt from *Arabidopsis*? *Functional Plant Biology* 32: 1-19. 2005.
- Tuzun, S. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107: 85-93. 2001.
- Vallad, G.E. & Goodman, R.M. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Science* 44: 1920-1934. 2004.
- van Loon, L.C.; Pierpoint, W.S.; Boller, T. & Conejero, V. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12: 245-264. 1994.
- van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. & Piterse, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483. 1998.
- Vieira Júnior, J. R. Procariontes residentes do filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. (Tese de Doutorado). Viçosa, MG. Universidade Federal de Viçosa. 2005.

## Capítulo 7

# Controle Biológico de Plantas Daninhas com Fitopatógenos

Robert Weingart Barreto

*Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia 36570-000 Viçosa, MG, Brasil,  
e-mail: rbarreto@ufv.br. Bolsista do CNPq.*

## Introdução

As plantas daninhas causam impactos negativos em ecossistemas terrestres e aquáticos, tanto nos intactos quanto naqueles transformados pelo homem. Em ambientes naturais, plantas introduzidas podem se tornar prejudiciais ao equilíbrio natural dos ecossistemas. Invasões biológicas por plantas, animais e microrganismos representam um problema de larga escala, produzindo mudanças significativas em termos de composição, estrutura ou processos nos ecossistemas invadidos. Elas representam uma ameaça à biodiversidade global, como hoje reconhecido por cientistas e governos (IUCN, 2000; Mack *et al.*, 2000). Plantas introduzidas podem modificar o habitat, diminuindo a diversidade da flora e da fauna, removendo fontes de alimento ou introduzindo fontes de alimento antes inexistentes, alterando a condição nutricional do solo, processos de sedimentação e outros. Essas alterações podem ter efeitos profundos na composição da flora e fauna da região e na paisagem como um todo, provocando a destruição de teias alimentares e até extinção de espécies que as compõem (Vitousek, 1994; Cronk & Fuller, 1997; Baruch *et al.*, 2000). Os impactos e desdobramentos de invasões por espécies exóticas são profundos e, comumente, irreversíveis. A melhor opção para se lidar com esse problema é evitá-las por meio de um controle quarentenário efetivo que exclua a introdução de espécies potencialmente invasoras. Infelizmente, na prática, as barreiras quarentenárias têm se mostrado ineficazes e o número de invasões biológicas, de todos os tipos, só tem crescido mundialmente. O controle biológico é reconhecido como a única estratégia sustentável para a mitigação dos problemas causados por essas invasões.

Em ambientes agrícolas, plantas daninhas competem diretamente com as culturas, reduzindo a sua produtividade, interferindo com as operações de colheita e servindo como hospedeiras alternativas para pragas e doenças das plantas cultivadas, além de afetar a qualidade do produto colhido. Em pastagens podem causar graves prejuízos à capacidade de sustentação dos pastos, havendo espécies que são extremamente prejudiciais por serem tóxicas se ingeridas pelo gado.

Os prejuízos econômicos causados pelas plantas daninhas são de difícil quantificação. Fletcher (1983) estimou que 10% da produção agrícola mundial são perdas devido à ação das plantas invasoras, enquanto que Parker & Fryer (1975) avaliavam estas perdas em 11,5%. Lorenzi (2000) considera que em regiões tropicais as perdas estão entre 30 e 40%. As estimativas de perdas agrícolas anuais, atribuídas às plantas invasoras, são incertas até mesmo para países desenvolvidos. Akobundu (1987) estimou para os EUA em US\$7,5 bilhões/ano, enquanto que para McWhorter & Chandler (1982) este valor seria de US\$14 bilhões.

Uma medida indireta da importância econômica das plantas daninhas é fornecida pelos valores de vendas de herbicidas. A demanda por herbicidas ao longo das últimas décadas tem crescido de forma impressionante. Na década de 1950, as vendas de herbicidas representavam menos de 20% do mercado mundial de agrotóxicos (Heywood, 1983). Em meados da década de 1980 chegavam a 48% (Jutsum, 1988) e na década de 1990, alcançaram cerca de 70% do mercado (Duke & Lydon, 1993). Em 2001, cerca de US\$2,6 bilhões foram gastos nos EUA com herbicidas, representando 58% do total de vendas de agrotóxicos naquele país (Kieley *et al.* 2004). No Brasil, a comercialização de herbicidas alcançou, aproximadamente, US\$1,215 bilhão em 1997 e chegou a US\$1,831 bilhão em 2004 (Sindag, 2005).

O crescimento do uso de herbicidas em todo o mundo tem um custo ambiental elevado. O impacto ambiental de herbicidas é por vezes pouco evidente, embora de grande gravidade. Embora a toxidez aguda para mamíferos dos herbicidas mais usados seja considerada baixa, este é apenas um dos aspectos relevantes quando se avalia o risco de sua utilização. O efeito de alguns herbicidas de ampla utilização sobre a reprodução de animais é um exemplo de prejuízo ambiental inesperado. Descobriu-se que, para determinados herbicidas, seu efeito é mais nocivo para a fertilidade de animais aquáticos em diluições menores do que em concentrações elevadas (Samuel, 2002).

Além dos problemas ambientais resultantes da sua aplicação em larga escala, como a redução da biodiversidade em ambientes agrícolas e a contaminação de lençóis freáticos, observa-se também um crescente comprometimento da eficácia de diversas moléculas de herbicidas, em função da progressiva seleção de populações de plantas daninhas resistentes. Atualmente, existe um registro global de 323 biótipos pertencentes a 187 espécies de plantas daninhas reconhecidos como resistentes a herbicidas (Heap, 2008). Adicionam-se a esses problemas o custo elevado e crescente do desenvolvimento de novas moléculas, as restrições e os custos impostos ao seu registro. A atenção de muitos pesquisadores tem se voltada para a busca por alternativas ao uso de herbicidas químicos que não ofereçam risco ao ambiente, sendo técnica e economicamente viáveis. Dentre as alternativas para o controle de plantas daninhas, tem especial destaque o controle biológico.

## **Controle Biológico de Plantas Daninhas: o Pioneirismo dos Entomologistas**

O controle biológico de plantas invasoras com insetos foi implementado, pela primeira vez, muito tempo antes que o primeiro herbicida químico chegasse ao mercado (Dinoseb, 1933). Há registro de que o inseto *Dactylopius ceylonicus* foi trazido do norte para o sul da Índia com o propósito de se controlar infestações da cactácea *Opuntia vulgaris* em 1836 (Julien, 1989). No entanto, consideram-se como marcos históricos para o controle biológico de plantas daninhas as iniciativas conduzidas pelo Hawaii Department of Agriculture, a partir de 1902, visando ao controle biológico de *Lantana camara*, pela introdução no Havaí de numerosas espécies de insetos provenientes do México (Perkins & Swezey, 1924; Waterhouse & Norris, 1987) e o espetacular controle da cactácea *Opuntia stricta* na Austrália obtido após a introdução da mariposa *Cactoblastis cactorum*, a partir da Argentina em 1925, levando em 1933 ao completo controle da planta em 24 milhões de ha (McFadyen & Willson, 1997). Desde então, centenas de insetos foram introduzidos como inimigos naturais de plantas daninhas em diferentes regiões do mundo (Julien & Griffiths, 1998).

A disciplina do controle biológico de plantas daninhas ainda é dominada pelas atividades dos entomologistas e existe um vasto acervo de informações publicadas sobre o uso de artrópodes no biocontrole de plantas daninhas. O tema, em seus vários aspectos e abordagens, foi objeto de revisões e tratado em alguns livros específicos (Harley & Forno, 1992; Julien & White, 1997). Outras fontes importantes de informação sobre os avanços neste campo são os anais dos simpósios internacionais onde se reúnem, em intervalos regulares desde 1969, ecologistas, entomologistas, fitopatologistas e outros cientistas que atuam no tema. Como exemplo, pode ser citado o “International Symposium on Biological Control of Weeds” que está em sua 12ª edição.

## **Utilização de Fitopatógenos: da Especulação à Aplicação Prática**

Embora o reconhecimento de que os fitopatógenos, e em particular os fungos, são importantes inimigos naturais de plantas invasoras seja antigo, o seu uso em programas de controle biológico é recente, tendo se iniciado nos anos 1970. Diversas revisões completas sobre este tema foram publicadas (Adams, 1988; Ayres & Paul, 1990; Charudattan, 1991; Evans & Ellison, 1990; Evans *et al.* 2001; Figueiredo, 1995; Hallet, 2005; Hasan, 1974; Hasan, 1980; Huffaker, 1976; Julien & White, 1997; TeBeest, 1984; TeBeest, 1991; TeBeest *et al.*, 1992; Templeton, 1982; Templeton, 1984; Wapshere, 1982; Watson, 1991, Yandoc-Ables *et al.* 2006).

Embora para o uso de insetos exista basicamente a estratégia chamada clássica, existem duas abordagens principais para o uso de fitopatógenos.

O método clássico ou inoculativo envolve a introdução de um patógeno inimigo natural de uma planta-alvo desde o seu centro de origem até a nova área de distribuição da planta onde ela, estando livre de seus inimigos naturais, tornou-se agressiva. Após sua introdução, quando o agente é bem sucedido, ele se multiplica e se distribui pela área de ocorrência da planta invasora, usualmente sem a necessidade de interferência humana, e ataca a planta-alvo reduzindo gradativamente a sua população até que um equilíbrio seja alcançado e a população da planta invasora esteja reduzida a níveis não prejudiciais para o ambiente ou os interesses humanos. O método de bioherbicida ou inundativo, que tipicamente envolve o uso de fitopatógenos endêmicos, predominantemente fungos (denominado de mico-herbicida) associados à planta-alvo, que são produzidos em massa, formulados e aplicados de modo semelhante a um herbicida químico onde a população da invasora está estabelecida.

Os exemplos de fitopatógenos efetivamente estudados para a utilização como agentes de biocontrole de plantas daninhas ainda são relativamente escassos. Essa carência é evidente quando se considera a grande diversidade de fitopatógenos associados a cada espécie de planta existente. Mesmo assim, alguns dos resultados obtidos nos projetos pioneiros, justificam otimismo em relação ao potencial da técnica.

## **Grupos de Fitopatógenos como Agentes de Biocontrole de Plantas Daninhas**

Os fungos representam o principal grupo de fitopatógenos utilizado para o controle biológico de plantas daninhas. Para o controle biológico clássico, existe o registro de 31 espécies de fungo efetivamente utilizadas para este fim, mas se combinado ao número de espécies investigadas ou em investigação o total chega a cerca de uma centena. Não há exemplos de aplicação prática em controle biológico clássico envolvendo bactérias, nematóides, vírus ou outros organismos (Tabela 1). Para a estratégia de bioherbicida, 12 espécies de fungos, uma de bactéria e uma de vírus foram utilizadas (Tabela 2). Essa situação resulta da diversidade de fungos fitopatogênicos associados às plantas daninhas e à capacidade que muitos fungos têm de produzir propágulos em abundância, de se dispersarem com facilidade sem a necessidade de vetores e de produzirem estruturas de resistência que permitem a sua sobrevivência durante períodos adversos.

Parker (1991), Robinson *et al.* (1978), Wapshere (1988), Watson (1986) e Seixas *et al.* (2004 a, b; 2007) relatam algumas espécies de nematóides que foram avaliadas para utilização em controle biológico clássico de plantas daninhas. No entanto, embora o potencial tenha sido demonstrado em alguns casos, não há registro de introdução de nematóides como agente em programa de controle biológico clássico. A abordagem de bioherbicida é, em princípio, menos favorável para o aproveitamento deste grupo de organismos pelo fato dos nematóides fitófagos serem organismos biotróficos, o que dificulta a sua produção massal.

**Tabela 1.** Programas de controle biológico clássico de plantas daninhas envolvendo a liberação de fitopatógenos exóticos

<b>Planta-alvo</b>	<b>Patógeno</b>	<b>País/continente de origem</b>	<b>País onde foi introduzido</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b>
<i>Acacia saligna</i>	<i>Uromykladium tepperianum</i>	Austrália	África do Sul	Sign.	Morris (1987); Lennox et al. (2004).
<i>Ageratina adenophora</i>	<i>Phaeoramularia eupatorii-odorati</i>	México	África do Sul	Parc./EI	Morris (1989); Wood (2008, com pess).
<i>Ageratina riparia</i>	<i>Entyloma ageratinae</i>	Jamaica	EUA (Havai) África do Sul Nova Zelândia	Sign. EI Sign.	Morin et al. (1997); Fröhlich et al. (1999); Trujillo (2005); Wood (2008, com pess)
<i>Asparagus asparagoides</i>	<i>Puccinia myrsiphylli</i>	Brasil	Austrália	Sign.	Morin et al. (2002); Morin et al. (2004); Morin et al. (2006)
<i>Baccharis halimifolia</i>	<i>Puccinia evadens</i>	EUA	Austrália	Sign.	Verna et al. (1996); Tomley & Willsher (2002)
<i>Carduus nutans</i>	<i>Puccinia carduorum</i>	Turquia	EUA	Sign.	Baudoin et al. (1993); Politis et al. (1984); Bruckart (2005)
<i>Carduus pycnocephalus</i> e <i>Carduus tenuiflorus</i>	<i>Puccinia cardui-pycnocephali</i>	Itália França	Austrália	Sign.	Burdon & Thrall (2002)
<i>Centaurea solstitialis</i>	<i>Puccinia jaceae</i> var. <i>solstitialis</i>	França	EUA	Rec.	CDFA (2008); Fisher et al. (2007)
<i>Chondrilla juncea</i>	<i>Puccinia chondrillina</i>	Itália	Austrália EUA, Argentina	Sign. Parc. EI	Hasan (1972); Cullen et al. (1973); Emge et al. (1981); Supkoff et al. (1988); Julen & Griffiths (1998).
<i>Clematis vitalba</i>	<i>Phoma clematidina</i>	EUA	Nova Zelândia	NE	Gourlay et al. (2000); S. Dodd (com. pess.)
<i>Clidemia hirta</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>clidemiae</i>	Panamá	EUA (Havai)	Parc.	Trujillo et al. (1986); Trujillo (2005)
<i>Cryptostegia grandiflora</i>	<i>Marvalia cryptostegiae</i>	Madagascar	Austrália	Sign.	Tomley & Evans (2004)
<i>Eichhornia crassipes</i>	<i>Cercospora piaropi</i>	EUA	África do Sul	Parc.	Conway & Freeman (1977); Morris et al. (1999)
<i>Galega officinalis</i>	<i>Uromyces galegae</i>	França	Chile	EI	Oehrens & Gonzalez (1975)
<i>Heliotropium europaeum</i>	<i>Uromyces heliotropii</i>	Turquia	Austrália	EI	Hasan et al. (1992); Hasan et al. (1995)

Continua



Tabela 1. Conclusão

Planta-alvo	Patógeno	País/continente de origem	País onde foi introduzido	Resultado	Referência
<i>Hieracium pilosella</i>	<i>Puccinia hieracci</i> var. <i>piloselloidarium</i>	Irlanda (via Austrália)	Nova Zelândia	In. *	S. Dodd (com. pess.)
<i>Lantana camara</i>	<i>Septoria</i> sp. ; <i>Prospodium tuberculatum</i> ; <i>Mycovellosiella lantanae</i> var. <i>lantanae</i>	Equador Brasil América do Sul	EUA (Havai) Austrália África do Sul	Parc. EI Rec.	Trujillo & Norman (1995); Barreto et al. (1995); Tomley et al. (2000); Tomley & Riding (2002); Den Breeÿen & Morris (2003); Den Breeÿen (2004)
<i>Miconia calvenscens</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>miconiae</i>	Brasil	EUA (Havai) Polinésia Francesa	Parc. Parc.	Meyer & Killgore (2000) ; Killgore et al. (1999) ; Meyer et al. (2008)
<i>Mikania micranta</i>	<i>Puccinia spengazzini</i>	Trinidade	Índia	Rec.	Ellison et al. (2008) ; Sankaran et al. (2008).
<i>Mimosa pigra</i> L.	<i>Diabole cubensis</i>	México	Austrália	EI	Evans (2000); Seier & Evans (1996).
<i>Mimosa pigra</i>	<i>Sphaerulina mimosae-pigrae</i>	México	Austrália	EI	Evans (2000) ; Seier & Evans (1996); Forno et al. (1996)
<i>Myrica faya</i>	<i>Septoria hodgessi</i>	EUA (Carolina do Norte)	EUA (Havai)	NE	Gardener et al. (1999); Killgore (com. pess.)
<i>Parthenium hysterophorus</i>	<i>Puccinia abrupta</i> var. <i>parthenicola</i>	México	Austrália	EI	Parker et al. (1994); Evans (2000)
<i>Parthenium hysterophorus</i>	<i>Puccinia melampodii</i>	México	Austrália	EI	Dhileepan (2006); Evans (2000)
<i>Passiflora tarminiana</i>	<i>Septoria passiflorae</i>	Colômbia	EUA (Havai)	Sign.	Trujillo et al. (1994); Trujillo (2005)
<i>Rubus constrictus</i> / <i>Rubus ulmifolius</i>	<i>Phragmidium violaceum</i>	Alemanha	Chile	Sign. EI	Oehrens & Gonzalez (1977)
<i>Rubus fruticosus</i>	<i>Phragmidium violaceum</i>	França	Austrália	Parc.	Bruzzese & Hasan (1986); Evans et al. (2004)
<i>Ulex europaeus</i>	<i>Uromyces genistae-tinctoriae</i> f. sp. <i>ulicis</i> , <i>Uromyces pisi</i> f.sp. <i>europaei</i>	Reino Unido	EUA (Havai)	NE	Gardner et al. (1996); Killgore (2008) (com. pess.)

\* Resultados: Sign- níveis de controle obtidos significativos; Parc- níveis de controle obtidos parciais; EI- agente estabelecido no local de introdução, mas níveis de controle obtidos insuficientes; NE - agente não estabelecido no local de introdução; Rec- introdução recente (avaliação impossível no momento); In- incerto (informação não disponível ou contraditória). \*Agente dispersado espontaneamente, sem interferência humana conhecida, a partir da Austrália.

**Tabela 2.** Bio-herbicidas com o desenvolvimento concluído, registrados ou comercializados. Adaptado de Barton (2005).

<b>Produto e agente</b>	<b>Planta-alvo</b>	<b>Cultura</b>	<b>País</b>	<b>Situação</b>
Biochon™: Chondrostereum purpureum	Prunus serotina e outras plantas lenhosas invasoras	Reflorestamentos	Holanda	Fabricado pela Koppert até fins de 2000. Volume pequeno de vendas e problemas com registro levou à interrupção de sua comercialização.
Milobern-Lc	Euphorbia heterophylla e outras euforbiáceas	Soja e outras culturas anuais	Brasil	Desenvolvimento concluído recentemente. Patente requerida. Não disponível comercialmente.
BioMal®: Colletotrichum gloeosporioides f. sp. malvae	Malva pusilla	Lentilha, linho e trigo	Canadá	Fabricação interrompida. Registro renovado por Encore Technologies LLC. Disponibilidade comercial incerta.
Camperico™: Xanthomonas campestris pv. poae	Poa annua	Campos de golfe	Japão	Situação incerta. Foi fabricado sob encomenda pela Japan Tobacco.
CASST™: Alternaria cassiae	Cassia spp.	Ameioim e soja	EUA	Não disponível comercialmente
Chontrol™ = Ecolear™: Chondrostereum purpureum	Plantas lenhosas invasoras	Caminhos e florestas	Canadá: 2004	Disponível comercialmente. Fabricante MycoLogic
Collego™ = LockDown	Aeschynomene virginica	Arroz e soja	EUA	Registrado e comercializado sob novo nome (LockDown) por ARI Inc.
DeVine®: Phytophthora palmivora	Morrenia odorata	Citrus	EUA	Situação incerta. No passado comercializado por Abbot Laboratories e disponível sob encomenda.
Dr BioSedge: Puccinia canaliculata	Cyperus esculentus	Algodão, batata, cana-de-açúcar, milho, soja	EUA	Registrado mas nunca comercializado em função de problemas técnicos na produção e existência de biótipos da planta resistentes ao fungo.
Hakatak: Colletotrichum acutatum	Hakea gummosis & Hakea sericea	Vegetação nativa	África do Sul	Nunca registrado. Fabricado sob encomenda.

Continua

**Tabela 2.** Conclusão

<b>Produto e agente</b>	<b>Planta-alvo</b>	<b>Cultura</b>	<b>País</b>	<b>Situação</b>
Lubao: <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> f. sp. <i>cuscutae</i>	<i>Cuscuta</i> spp.	Soja	China	Produção em escala artesanal
Mycotech™ pasta: <i>Chondrostereum purpureum</i>	Plantas lenhosas decíduas invasoras	Caminhos e florestas	Canadá: 2004	Disponível comercialmente. Fabricante Myco-Forests Co.
Smolder: <i>Alternaria destruens</i>	<i>Cuscuta</i> spp.	Culturas diversas, viveiros de plantas ornamentais	EUA	Registrado em 2005. Comercialização planejada pela Platte Chemical Co para 2007. Não há informação sobre situação do produto.
SolviNix LC: Tobacco mild green mosaic tobamovirus	Tropical soda apple ( <i>Solanum viarum</i> )	Áreas naturais e campos	EUA	Permissão para uso experimental. Solicitação de registro submetida à EPA
Stumpout™; <i>Cylindrobasidium leave</i>	Várias espécies de <i>Acacia</i>	Vegetação nativa	África do Sul	Disponível para venda em 2005 embora a demanda fosse pequena.
Woad Warrior: <i>Puccinia thlaspeos</i>	<i>Isatis tinctoria</i>	Áreas cultivadas, pastagens, terrenos abandonados e margens de rodovias	EUA	Registrado mas nunca comercializado. Depois de registrado o fungo foi amplamente distribuído pelos pesquisadores.

Para as bactérias não há exemplo de aplicação em controle biológico clássico e apenas um produto (Camperico®) conhecido de aplicação como bioherbicida (Imaizumi *et al.* 1997). Esse produto é resultado de um estudo completo com *Xanthomonas campestris* pv. *poae* e demonstrou a viabilidade da utilização de bactérias na estratégia de bioherbicida. Este é um grupo de fitopatógenos que, em muitos casos, não tem limitações importantes quanto à produção massal.

Uma inovação recente no campo dos bioherbicidas foi o desenvolvimento de um vírus (“Tobacco Mild Green Mosaic Virus”) como bioherbicida. Este vírus produz uma reação letal de hipersensibilidade quando aplicado sobre plantas de *Solanum viarum* (joá-bravo). Os testes demonstraram que este vírus é um agente de biocontrole eficiente e específico. Existe um pedido de patente para este organismo sob avaliação nos EUA (Charudattan *et al.*, 2004). Parece, no entanto, pouco provável que as aplicações de vírus neste campo se tornem comuns em função das limitações impostas pela sua condição de organismos biotróficos, pelo fato de muitos dependerem da ação de vetores para se dispersarem e ainda pela falta de especificidade de muitos deles.

## **Etapas no Desenvolvimento de Programas para o Controle Biológico Clássico de Plantas Daninhas**

Embora existam diferenças significativas entre a implementação de programas de controle biológico de plantas daninhas que utilizam artrópodes ou fitopatógenos e entre os que envolvem as estratégias clássica ou de bioherbicida, há diversos pontos em comum entre eles. Os pontos ou etapas a serem considerados na implementação de um programa de controle biológico clássico, segundo Schroeder (1983) e Forno (1997) são:

**1. Seleção da espécie de planta daninha (planta-alvo).** A primeira vista, esta pode parecer uma questão de fácil resolução, pois um programa de controle biológico de planta daninha costuma ser desencadeado pelo reconhecimento da existência de um problema de natureza econômica ou ambiental provocado pelas infestações de determinada planta. No entanto, essa é uma questão delicada. A começar pela real identidade da planta-alvo. Para muitas das principais plantas daninhas existem problemas e controvérsias sobre a sua classificação (McNeil, 1982). Na escolha deve-se, na medida do possível, evitar alvos que tenham potencial de gerar conflitos de interesse. Muitas plantas invasoras são úteis e desejáveis fora do ambiente onde causam prejuízos ou problemas, por exemplo, por terem valor ornamental, produzirem frutos comestíveis ou serem úteis para a apicultura. Esse é um tema bastante discutido na literatura e, em pelo menos um país (Austrália), existe legislação específica criada para a resolução de tais conflitos. Há ainda outras considerações de ordem ecológica, prática e política que devem ser consideradas quando da seleção de plantas-alvo para o controle biológico. Charudattan (2005) discute amplamente a questão da escolha de plantas-alvo. No Brasil, existe pouco reconhecimento sobre os graves problemas que o país enfrenta com invasões biológicas por plantas exóticas, embora não sejam poucos. Diversos exemplos são discutidos por Ellison & Barreto (2004) e Barreto (2008).

## **2. Revisão da literatura sobre a planta-alvo e seus inimigos naturais.**

Inclui-se usualmente uma busca em herbários contendo amostras representativas da flora do país onde a planta-alvo é nativa. A busca é por dados referentes às localidades de ocorrência das plantas. O valor estratégico desta informação, na orientação do esforço de coleta, é confirmado pelo número significativo de vezes em que se consegue reencontrar uma planta-alvo (e seus inimigos naturais) a partir da informação obtida das etiquetas de herbários.

**3. Levantamento dos inimigos naturais presentes nas regiões onde o problema está ocorrendo.** No passado, este era um aspecto negligenciado em programas de controle biológico clássico. No entanto, estes levantamentos são importantes, sobretudo para que se evite o desperdício de esforço e recursos (sem mencionar o embaraço) envolvido numa possível introdução de agentes que já estavam previamente estabelecidos na área onde se pretendia implementar o projeto. A pré-suposição de que uma planta exótica sob investigação para o controle biológico tenha se tornado um problema porque nenhum dos inimigos naturais que contribuem para o seu controle no centro de origem está presente na nova área, é muitas vezes equivocada. Encontrou-se, por exemplo, sobre *Cyperus rotundus*, planta originária da África e Ásia e comumente reconhecida como “a pior planta invasora do mundo”, sete espécies de fungos fitopatogênicos no Brasil. Nenhuma destas havia sido anteriormente relatada sobre este hospedeiro no país. Uma dessas espécies (*Ascochyta cyperiphthora*) foi reconhecida e descrita como espécie nova para a ciência (Barreto & Evans, 1995b; Pomella & Barreto, 1995; Pomella & Barreto, 1997). Outro exemplo é o de *Hedychium coronarium*, uma planta originária do Himalaia que invade ecossistemas florestais e várzeas úmidas no sul e sudeste do Brasil. Sobre a qual foram encontradas sete espécies de fungos, algumas das quais poderiam ser consideradas, erroneamente, para introdução em programas de controle biológico clássico, caso encontradas durante levantamentos no centro de origem (Soares & Barreto, 2008). Isto revela que, na introdução de uma planta exótica, é possível que parte de seus inimigos naturais possa também acompanhá-la. Revela também que os registros disponíveis sobre a ocorrência de fitopatógenos em plantas daninhas são, em geral, incompletos. Isso é natural, pois a prioridade dos fitopatologistas é dada a investigação patógenos de plantas cultivadas em detrimento das demais. Portanto, os levantamentos prévios dos inimigos naturais existentes na região onde ocorre o problema com a planta daninha são recomendáveis. No caso de *Hedychium coronarium*, levantamentos por inimigos naturais foram recentemente iniciados na Índia visando a futura realização de programas de controle biológico clássico desta e de outras espécies daninhas do gênero *Hedychium* e o levantamento previamente feito no Brasil exclui a introdução de alguns fungos que poderiam ser erroneamente tratados como tendo potencial para o biocontrole.

**4. Obtenção do financiamento para o projeto.** Esta pode ser uma das etapas mais desafiadoras para os envolvidos no desenvolvimento de programas de controle biológico de plantas daninhas. Por vezes, o pesquisador não se vê diretamente envolvido com essa preocupação, pois é procurado por parceiros potenciais que têm recursos disponíveis para a

pesquisa. No entanto, comumente, o encargo da busca por recursos também cabe aos pesquisadores envolvidos no programa. O controle biológico clássico é tipicamente conduzido e financiado pelo setor público, pois, quando bem sucedido, gera benefícios para a sociedade ou parte dela, como os agricultores, além de benefícios para o ambiente. Não há a geração de um produto comercializável e nem lucro mensurável de forma objetiva. Mesmo em países como a África do Sul, Austrália, EUA e Nova Zelândia onde há uma longa tradição nesta disciplina e existe um amplo conhecimento sobre o valor do controle biológico pelo público e pelas autoridades, a obtenção de financiamento para novos programas é difícil. Tais programas são demorados e dispendiosos e não há garantias prévias de sucesso. Isso explica, embora não justifique, a reticência dos políticos e administradores em alocar recursos para financiar estes trabalhos. Para países como o Brasil, onde não existe um conhecimento amplo sobre o valor desta estratégia ou uma tradição nesta área, o desafio para os pesquisadores envolvidos é ainda maior, pois exige-se deles um esforço para o convencimento tanto do público quanto das autoridades sobre a segurança e potenciais benefícios do controle biológico de plantas daninhas.

**5. Levantamentos de agentes de controle biológico no centro de origem da planta-alvo.** É necessário enfatizar a necessidade e o valor de se estabelecer vínculos de cooperação com pesquisadores e instituições nos países onde se pretende coletar, bem como a necessidade de se cumprir as normas vigentes quanto à permissão para coleta e exportação dos organismos. O desrespeito a estes procedimentos pode prejudicar ou mesmo inviabilizar o programa e expor os pesquisadores a riscos, além de comprometer a imagem da disciplina no país onde a coleta está sendo efetuada.

**6. Identificação dos organismos coletados.** Muitas vezes os organismos associados a uma planta daninha são completamente desconhecidos. Um organismo que não teve a sua identidade esclarecida não é aceitável para a utilização como agente de controle biológico. A identificação ou descrição desses taxa depende do apoio de taxonomistas ou do envolvimento direto dos cientistas nesta tarefa. A experiência mostra que muitos dos cientistas envolvidos nesses programas tem interesse, treinamento e afinidade pelo campo da taxonomia ou acabam desenvolvendo-o por necessidade. A identificação dos organismos coletados representa tanto um desafio como uma fonte de novidades taxonômicas que podem ser aproveitadas pelos pesquisadores. Como alternativa, na falta de especialista em taxonomia na equipe, busca-se o apoio de especialistas externos ao grupo. A experiência nessa área, na Universidade Federal de Viçosa, tem sido muito proveitosa e tem resultado em publicações que contribuem para a expansão do conhecimento da micobiota brasileira com a descrição de dezenas de novos taxa fúngicos (Barreto & Evans, 1994, 1995ab, 1996, 1998; Barreto *et al.*, 1995; Pereira & Barreto, 2000; Pereira & Barreto, 2005; Pereira & Barreto, 2006; Pereira *et al.*, 2007; Seixas *et al.*, 2007).

**7. Esclarecimento de aspectos relevantes da biologia dos organismos.** Esta etapa inclui a elucidação dos ciclos de vida dos organismos candidatos a agentes de biocontrole.

### **8. Avaliação do potencial para uso como agente de controle biológico.**

Várias tentativas foram feitas por entomologistas e fitopatologistas para o estabelecimento de sistemas de ranqueamento de atributos que pudessem indicar quais, dentre os diversos agentes descobertos nos levantamentos, mereceriam receber a prioridade no âmbito de um programa. Infelizmente, desde que o primeiro sistema foi proposto para insetos por Harris (1973), com subseqüentes aperfeiçoamentos, o consenso, após 20 anos de pesquisa, é de que “estes foram uma contínua fonte de frustrações e desperdício de recursos... ao ponto de muitos pesquisadores considerarem que estes não são úteis, preferindo confiar na liberação dos agentes como o único teste válido para avaliação de seu potencial” (Cullen, 1992). A avaliação do potencial e a escolha da ordem de preferência dos agentes disponíveis é usualmente feita com base na combinação das observações dos níveis de severidade da doença, produzida pelo patógeno, em condições naturais; da demonstração, em condições controladas, da patogenicidade para o biótipo ou biótipos da planta envolvida no processo de invasão e do grupo taxonômico ao qual pertence o patógeno. Se o organismo pertence a um grupo com um bom retrospecto como agente eficaz e seguro quanto à especificidade em relação ao hospedeiro (tradicionalmente havendo preferência para os fungos da ordem Uredinales que causam as ferrugens), então ele assume uma posição prioritária na lista de possíveis agentes a serem utilizados.

### **9. Estudo da ecologia da planta daninha e seus inimigos naturais no centro de origem e na região onde estão ocorrendo as infestações.**

**10. Avaliação da especificidade.** O controle biológico de plantas daninhas é baseado em princípios desenvolvidos e refinados por entomologistas ao longo dos últimos 100 anos. Entre estes, a especificidade é considerada como uma das “pedras fundamentais” da disciplina. Sua avaliação equivale a uma análise de risco que visa evitar a introdução de agentes polípagos que poderiam atacar plantas cultivadas ou nativas não-alvo do programa. O histórico da disciplina é ao mesmo tempo impecável em termos de segurança e impressionante em termos de retornos econômicos (McFadyen, 1998). Em avaliação feita por Barton (2004), de todos os fungos fitopatogênicos introduzidos em programas de controle biológico clássico de plantas daninhas, não houve qualquer relato de “efeito colateral”, ou seja, ataque pelo fungo introduzido como agente de controle biológico a alguma outra espécie que não a alvo. A ampla adoção, desde os anos 70, do protocolo proposto por Whapshere (1974), com o nome de “teste centrífugo-filogenético”, contribuiu certamente para a produção desse histórico favorável para os fitopatógenos. Esse teste envolve a exposição inicial de um pequeno grupo de plantas com grande afinidade evolutiva com a espécie-alvo. Posteriormente, numa sequência organizada, envolve espécies pertencentes a grupos taxonômicos menos afins aos da planta-alvo (variedades da mesma espécie da planta-alvo, espécies do mesmo gênero, espécies da mesma tribo, espécies de gêneros da mesma família, espécies pertencentes a famílias da mesma ordem da planta-alvo) e incluindo, finalmente, plantas-salvaguarda (espécies cultivadas relevantes para o país onde se pretende introduzir o agente, espécies de plantas relatadas como hospedeiras do agente de biocontrole ou de organismos com proximidade filogenética ao agente). A lista final de espécies

de plantas, a serem incluídas no teste, depende fortemente da família botânica à qual pertence a planta e das exigências das autoridades (comumente daquelas envolvidas em quarentena vegetal ou da área ambiental) do país onde se pretende introduzir o agente. Assim, quando a planta-alvo é de uma família botânica extensa e de grande importância agrícola (Asteraceae, Fabaceae ou Poaceae, por exemplo), a lista de plantas a ser testada será necessariamente grande. Em outras circunstâncias, quando se pretende controlar uma planta pertencente a uma família para a qual não há espécies economicamente relevantes, nem pertencentes à flora nativa, como por exemplo, melastomatáceas no Havaí ou comelináceas na Nova Zelândia, a lista de plantas a ser incluída no teste pode ser reduzida. Os testes são conduzidos com a inoculação das plantas-teste com propágulos de um isolado selecionado e para o qual a virulência tenha sido demonstrada. A avaliação pode ser feita pelo simples registro de reprodução ou não da doença. Há, no entanto, refinamentos como o descrito por Evans (2000) em que se utilizam técnicas histológicas que permitem rastrear, categorizar e descrever o progresso da interação fungo-planta após a deposição do inóculo. De forma geral, os agentes que se mostram inespecíficos são rejeitados, enquanto que outros que se mostrem específicos são considerados para fins de introdução. Barton (2004) conclui de sua ampla investigação sobre o assunto que “os resultados dos testes de especificidade têm frequentemente se mostrado conservadores, havendo vários exemplos de patógenos que atacam plantas que não eram o alvo durante os testes, mas que nunca infectaram estas espécies no campo após a sua liberação” e ainda que “a análise de risco baseada em testes de especificidade rigorosos, combinada com uma boa compreensão da taxonomia, biologia e ecologia de um agente ... pode garantir que a introdução de um patógeno seja um método seguro e ambientalmente benigno para o controle de plantas invasoras”.

**11. Obtenção de aprovação para importação do agente de biocontrole e sua introdução.** Ao fim dos estudos, apresenta-se à autoridade responsável um relatório completo. Depois de sua apreciação e decisão final, a autorização para importação e liberação do agente pode ser concedida ou negada.

#### **12. Importação dos agentes.**

**13. Multiplicação em quarentena.** Em diversos países existem laboratórios credenciados e devidamente equipados para onde são encaminhados os agentes obtidos no centro de origem da planta-alvo. No Brasil, um dos responsáveis é o Laboratório de Quarentena “Costa Lima”, da Embrapa Meio Ambiente. Depois que a autoridade responsável se manifesta favoravelmente pela introdução e o agente é importado, comumente este é acompanhado e multiplicado em condições controladas em quarentena para um estudo final e exclusão de materiais eventualmente anormais. Isolados de fitopatógenos com baixa virulência, contaminados, atacados por hiperparasitos ou que apresentem outros problemas são descartados nesta etapa. Os isolados em boas condições são multiplicados para que se obtenha material que será levado ao campo.

**14. Liberação.** A estratégia para a liberação varia bastante, de acordo com a natureza do patógeno (se parasita necrotrófico ou biotrófico, por exemplo) e com a abrangência e facilidade de acesso às áreas infestadas.



**15. Avaliação de impactos pós-liberação.** A disciplina é bastante carente de exemplos de estudos detalhados do efeito obtido após a liberação dos agentes, principalmente devido à relutância dos agentes financiadores de custear as despesas envolvidas. Dependendo das circunstâncias, pode passar um período longo até que o estabelecimento de um agente seja confirmado e mais tempo ainda até que um impacto significativo seja verificado – tipicamente de dez a doze anos, de acordo com Lawton (1984). De todo modo, a omissão desta etapa faz com que os resultados obtidos de muitas introduções de artrópodes ou fungos sejam limitados a opiniões avulsas sobre o sucesso ou fracasso e, portanto, com pouco valor. “Pode-se argumentar que houve sucesso no controle biológico apenas quando uma avaliação apropriada tiver demonstrado que os agentes provocaram o decréscimo da densidade populacional da planta daninha... ou inibiram a distribuição da planta...” (Hoffmann, 1990). Conforme discutido por Farrell & Lonsdale (1997), há uma série de razões pelas quais deve-se medir o impacto resultante da liberação de um agente de biocontrole: para determinar, de forma conclusiva, se a introdução resultou em sucesso ou fracasso e assim prestar contas às agências financiadoras e gerar evidências em favor de novas iniciativas na área; para decidir sobre futuras direções a se tomar no programa de controle biológico; para o desenvolvimento de estratégias de controle integradas; e, para contribuir para o avanço na teoria e na prática do controle biológico mediante reconhecimento de fracassos e sucessos e do entendimento de suas causas. Diversos procedimentos para avaliação são ainda discutidos por estes autores. Um dos mencionados é a preparação de fotografias nas áreas infestadas tomadas antes da liberação do agente e em intervalos regulares (especialmente na mesma época do ano) depois da sua introdução. Este procedimento, embora válido e bastante ilustrativo, deve ser combinado com avaliações detalhadas de área de ocorrência da planta, densidade populacional e biomassa, fertilidade, evolução de banco de sementes e outros aspectos quantificáveis relativos à população da planta nas áreas infestadas.

## **Etapas no Desenvolvimento de Bioherbicidas para o Controle de Plantas Daninhas**

Várias das etapas e dos cuidados básicos que devem ser tomados durante o desenvolvimento de bioherbicidas são comuns para as duas estratégias, outras se aplicam apenas para uma delas. Enumera-se abaixo as etapas comumente cumpridas para o desenvolvimento de um produto comercial.

**1. Seleção da espécie de planta daninha (planta-alvo).** A prioridade deve ser dada às plantas daninhas que causem problemas suficientemente graves e de amplitude suficiente. Esse requerimento visa garantir a existência de um nicho de mercado suficiente para justificar o investimento em pesquisa e na produção comercial de um produto que, em geral será capaz de controlar apenas uma ou poucas espécies daninhas. Espécies invasoras de culturas importantes, para as quais a ocorrência de populações resistentes a herbicidas tenha se tornado comum (por exemplo, *Bidens* spp., *Brachiaria plantaginea*,

*Commelina* spp., *Conyza* spp., e *Euphorbia heterophylla* na cultura da soja), espécies que sejam importantes para culturas para as quais existam poucos produtos registrados (por exemplo, *Cyperus* spp. em hortaliças) ou que infestem áreas onde a aplicação de herbicidas químicos é proibida ou desaconselhada (plantas invasoras em ambientes dulcícolas) são alvos favoráveis para o desenvolvimento de bioherbicidas. Muitos produtos pioneiros na área foram desenvolvidos sem que sua viabilidade comercial fosse considerada, o que comprometeu, em certa medida, a imagem dos bioherbicidas.

## **2. Revisão da literatura sobre a planta-alvo e seus inimigos naturais.**

**3. Levantamento dos inimigos naturais presentes nas regiões onde o problema está ocorrendo.** Trata-se de etapa fundamental em programas de desenvolvimento de bio-herbicidas, pois estes, usualmente, têm como alvo plantas nativas que tiveram sua população aumentada anormalmente em função de alguma alteração do ambiente (práticas agrícolas, poluição de ecossistemas aquáticos ou outras). É com os patógenos endêmicos (que estão presentes nas regiões onde ocorrem as infestações, mas são ineficientes no controle da planta-alvo se não houver uma intervenção artificial), que se busca desenvolver estes produtos. Nesta fase, o trabalho é comumente feito com financiamento governamental ou então com recursos próprios. Efetuam-se prospecções visando detectar a ocorrência de organismos com potencial para o desenvolvimento de um bioherbicida, ou confirmar a existência desses organismos, previamente indicada pela informação disponível na literatura. Depois da obtenção de evidências de que esta abordagem tem potencial para o controle de determinada planta-alvo, busca-se então parcerias com investidores privados.

**4. Obtenção do financiamento para o projeto.** A estratégia de bioherbicida visa ao desenvolvimento de produtos que podem ser patenteados, registrados, produzidos industrialmente e comercializados. Embora possam ser lucrativos, enquanto não houver exemplos disponíveis de expressivo sucesso comercial para os bioherbicidas, é improvável que as grandes empresas se envolvam diretamente no desenvolvimento destes produtos. Restam, como possíveis patrocinadores, instituições governamentais, pequenas empresas, cooperativas ou outras associações de produtores que estejam expostos a problemas específicos com uma espécie de planta daninha determinada e se vejam motivadas a investir para a resolução do problema.

## **5. Identificação dos organismos coletados.**

**6. Esclarecimento de aspectos relevantes da biologia e do ciclo de vida do organismo.**

**7. Avaliação do potencial para uso como agente de controle biológico.** É feita, à semelhança do descrito para os programas de controle biológico clássico, mas a preferência é dada aos patógenos passíveis de isolamento e cultivo em meio de cultura, pois é apenas com esses que a produção massal e o desenvolvimento de um produto comercial são viáveis.

**8. Avaliação da especificidade.** Esta também é uma etapa comum às duas estratégias, e o protocolo descrito é aplicado na avaliação de organismos passíveis de serem utilizados como bioherbicidas. Um agente de controle biológico ideal deve ter largo espectro dentro dos diversos biótipos da espécie que se pretende controlar. Este leque pode inclusive ser mais extenso, envolvendo outras plantas além do alvo original. O grau de exigência quanto à especificidade do patógeno é mais flexível para o caso dos bioherbicidas, pois nesta estratégia não há a introdução de um patógeno exótico para o país nem os riscos decorrentes desta operação. Assim, as restrições quarentenárias usualmente inexistem ou são menores. Os cuidados principais devem ser quanto à possível infectividade do patógeno para a cultura onde o bioherbicida será aplicado e outras culturas que possam ser expostas. Um exemplo conhecido de fungo inespecífico utilizado como micoherbicida é o de *Chondrostereum purpureum* utilizado para o controle do arbusto invasor *Prunus serotina* e outras plantas lenhosas infestantes de reflorestamentos. Trata-se de um patógeno capaz de atacar plantas cultivadas do gênero *Prunus*. No entanto, estudos epidemiológicos demonstraram que, guardada uma distância de segurança em relação aos pomares de ameixa, pêssego e outras rosáceas suscetíveis, o seu uso é seguro. Assim, um produto foi desenvolvido (BioChon®) e comercializado na Holanda. A experiência foi mais tarde reproduzida em outros países com bons resultados (Jong, 2000).

**9. Determinação das condições exigidas pelo organismo para crescimento, esporulação, estabelecimento de infecção e produção de doença em níveis de severidade adequados para o controle da planta daninha.** Este é um conjunto amplo de testes que deve ser realizado para uma completa avaliação do organismo sob condições controladas. A influência de condições ambientes (temperatura, fotoperíodo, umidade) sobre o desenvolvimento do fungo, isoladamente ou interagindo com a planta, deve ser determinada. O estabelecimento da concentração de inóculo, necessária para a produção de níveis de severidade de doença e de controle adequados e o efeito do agente sobre plantas em suas diversas fases de desenvolvimento (comumente incluindo o efeito sobre as sementes) são aspectos que também costumam ser investigados.

**10. Estudos de compatibilidade com herbicidas e adjuvantes e testes de formulações.**

**11. Determinação da viabilidade do patógeno durante o armazenamento sob diversas condições (vida de prateleira).**

**12. Desenvolvimento de método adequado para a produção massal do organismo.**

**13. Demonstração da eficiência do pré-produto em condições de campo.**

**14. Obtenção de registro e licenciamento do produto.** Envolve uma série de providências determinadas na legislação e pelas quais devem ser apresentados testes de eficiência agrônômica, avaliação toxicológica e ambiental. Esta questão, embora de grande relevância, não será tratada neste texto.

**15. Produção e comercialização.**

## Uso de Fitopatógenos no Controle Biológico de Plantas Daninhas: Exemplos, Perspectivas e Limitações

Wilson (1969) alertou para o potencial inexplorado da utilização de fitopatógenos como agentes de biocontrole de plantas daninhas e forneceu exemplos de usos possíveis e aplicações empíricas supostamente efetuadas por agricultores da América do Norte, na estratégia clássica, antes que houvesse exemplo com embasamento técnico da aplicação desta disciplina no ocidente. O primeiro exemplo de aplicação do método clássico, envolvendo fungos fitopatogênicos, foi divulgado poucos anos depois da publicação do trabalho de Wilson. Ele consistiu na introdução, a partir do Mediterrâneo, do fungo *Puccinia chondrillina* na Austrália para o controle da planta invasora *Chondrilla juncea* (Cullen *et al.*, 1973; Cullen & Hasan, 1988; Mortensen, 1986). A redução obtida em pouco mais de um ano, na população desta planta em áreas infestadas foi superior a 99%. A relação custo/benefício deste programa foi espetacular. O crescimento da produção agrícola nas áreas afetadas pela presença desta planta, somado à economia resultante da redução do consumo de herbicidas tem resultado numa economia anual de AU\$16 milhões. Este valor é cumulativo enquanto que o custo total do programa foi de AU\$3 milhões.

Há registro de que 31 espécies de fitopatógenos foram até hoje introduzidas em programas de controle biológico clássico de plantas daninhas em todo o mundo (Tabela 1). Todas são espécies de fungos, sendo que 16 são reconhecidas como tendo contribuído parcial ou significativamente para o controle das populações da planta-alvo em pelo menos um dos países onde foi introduzida.

Os programas de pesquisa voltados para o método de bioherbicida resultaram no desenvolvimento de alguns produtos comerciais, dentre eles: DeVine®, formulação líquida contendo clamidósporos do fungo *Phytophthora palmivora*, registrado em 1981 para o controle de *Morrenia odorata* nos EUA (Ridings *et al.*, 1974; Kenney, 1986); Collego®, pó-molhável contendo propágulos de *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* para o controle de *Aeschynomene virginica* nos EUA (Daniel *et al.*, 1973; Templeton, 1984; Charudattan, 1991); e BioMal®, *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* que controla eficazmente *Malva pusila* no Canadá (Mortensen, 1988; Poirier *et al.*, 1985). Embora representem demonstrações notáveis da viabilidade da abordagem inundativa no controle de plantas daninhas, nenhum destes produtos teve uma trajetória comercial consistente e de sucesso. Mesmo alcançando níveis excelentes de controle das plantas-alvo, estes produtos, desde o seu desenvolvimento original, estavam fadados a atender um mercado limitado. Esses produtos controlavam espécies de plantas daninhas que representavam problemas pontuais em algumas culturas e regiões específicas (*Morrenia odorata* - invasora importante em algumas áreas de plantio de citros na Flórida-EUA; *Aeschynomene virginica* - invasora na cultura do arroz no Arkansas-EUA; *Malva pusila* - invasora de pequena importância em grandes culturas e de importância algo maior para pequenas culturas no Canadá).

As limitações observadas para estes exemplos pioneiros, devidas às escolhas inapropriadas das plantas-alvo para os produtos, não foram superadas pela simples mudança de foco para plantas-alvo de maior relevância e abrangência. Há problemas para se atender com os bioherbicidas a premissa de que seu efeito deve ser equivalente ao dos herbicidas químicos. O atendimento da expectativa de que um bio-herbicida produza uma eliminação completa da planta-alvo, tenha uma longa vida de prateleira e compita economicamente com os herbicidas químicos pode ser, em muitos casos, impossível.

A maioria dos fungos fitopatogênicos avaliados para o desenvolvimento como micoherbicidas falharam devido às limitações biológicas, tecnológicas ou comerciais (Auld & Morin, 1995). A necessidade de longos períodos de molhamento, uma baixa fecundidade, baixa virulência e nichos de mercado restritos são impedimentos comuns no desenvolvimento de micoherbicidas. As limitações tecnológicas e biológicas são ativamente pesquisadas em busca de sua superação para diversos micoherbicidas potenciais, mas, os cientistas têm pouco a fazer quanto às limitações de natureza comercial, além de efetuar escolhas mais bem fundamentadas de plantas-alvo com as quais irão trabalhar (Evans *et al.* 2001).

Embora a situação de vários dos bioherbicidas seja obscura, existem cerca de 14 produtos mencionados na literatura como tendo o seu desenvolvimento concluído (Tabela 2). Dentre estes, apenas quatro ou cinco parecem estar disponíveis comercialmente. Em muitos casos, os organismos avaliados como potenciais agentes de controle biológico têm ótimo desempenho, quando testados em pequena escala sob condições controladas, mas são ineficientes quando aplicados no campo. Dentre as razões comumente enumeradas, para este desfecho frustrante, estão o efeito negativo do micro-ambiente a que o organismo passa a ser exposto; a redução de virulência resultante do método de produção massal ou do substrato utilizado e os fatores relacionados à ecologia do filoplano, tais como a presença de uma flora microbiana antagonista sobre as plantas que estão no campo. Embora possam existir limitações biológicas ou ambientais em qualquer sistema de bioherbicida que se estude, muitos patógenos apresentam uma alta eficiência e, mesmo assim, nunca se tornam produtos comercialmente bem sucedidos. Isso pode resultar de complicações políticas, requerimentos legais e questões econômicas e empresariais. Após 30 anos de pesquisa, a disciplina ainda carece de um exemplo de sucesso de grande alcance que provoque o interesse de investidores nos bioherbicidas. Talvez, com o aparecimento de tal exemplo, o cenário atual seja alterado. Há discussões detalhadas publicadas, recentemente sobre este tema (Ghosheh, 2005; Hallett, 2005).

## **Considerações Finais – o Controle Biológico de Plantas Daninhas na América Latina e no Brasil**

O fitopatologista latino-americano Edgardo Oehrens Bertossi, do Chile, foi, possivelmente, o primeiro cientista no ocidente a propor objetivamente o uso de fungos fitopatogênicos, no caso, uma ferrugem, para o controle biológico de plantas daninhas (Oehrens, 1963). Isso foi antes, portanto, da publicação mais conhecida

de Wilson (1969). Oehrens foi além da simples conjectura e conduziu, mais tarde, a primeira introdução de um fitopatógeno para o controle biológico de uma planta daninha exótica na América Latina – a da ferrugem *Phragmidium violaceum* contra *Rubus* spp. (Oehrens & Gonzalez, 1977). Esta introdução foi bem sucedida e resultou no controle de uma das espécies-alvo. Esta realização foi notável, pois se tratou praticamente de uma iniciativa individual e pioneira em escala mundial. A iniciativa de Oehrens ocorreu quase que simultaneamente à introdução de *Puccinia chondrillina* na Austrália, em programa envolvendo equipe numerosa e financiamento farto.

Apenas dois outros exemplos de introduções de fitopatógenos para o biocontrole de plantas daninhas na América Latina se seguiram: *Uromyces galegae* contra *Galega officinalis* também no Chile, por iniciativa de Oehrens (Oehrens & Gonzalez, 1975); e a tentativa de reprodução, na Argentina, dos bons resultados obtidos com a introdução de *Puccinia chondrillina* contra *Chondrilla juncea* (Julien & Griffiths, 1998). Ambos foram mal sucedidos. Desde então, não há exemplos de iniciativa envolvendo a estratégia clássica de biocontrole com fitopatógenos para a América Latina. Para o Brasil, não há registro de projetos nesta área.

Um levantamento das atividades em controle biológico de plantas daninhas na América Latina, envolvendo o uso de artrópodes ou de patógenos, foi feito recentemente (Barreto, 2008) e revelou a existência de 16 núcleos de pesquisa, sendo oito no Brasil. Este número pode parecer significativo, mas repete-se no Brasil o que ocorre para o conjunto dos núcleos na América Latina, onde vários estão inativos ou dependem inteiramente do interesse de um pesquisador para permanecer ativos. A lista inclui grupos nas seguintes instituições e sob a liderança dos seguintes pesquisadores: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp/FCAV Jaboticabal) – R. A. Pitelli; Universidade Federal de Viçosa – R. W. Barreto; Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – E. Fontes e S. Mello; Embrapa Soja – J. T. Yorinori; Fundação Universidade Regional de Blumenau – M. D. Vitorino; Unicentro – C. Wikler; Universidade Federal do Paraná – J. H. Pedrosa-Macedo; e, Embrapa Clima Temperado – G. Nachtigal.

Desses núcleos, três estão inativos e dois dependem da liderança de pesquisadores que estão aposentados. Ou seja, a disciplina no Brasil está longe de consolidada. Esta situação se repete em escala latino-americana. Talvez, as únicas exceções sejam os laboratórios mantidos por governos estrangeiros na América Latina (USDA-ARS SABCL, mantido pelo governo dos EUA na Argentina; e CSIRO Lab., mantido pelo governo Australiano no México).

A atividade dos grupos de pesquisadores atuando em controle biológico de plantas daninhas no Brasil é, em sua maioria, voltada para a colaboração com programas de controle biológico clássico envolvendo a busca e o estudo de inimigos naturais de plantas daninhas nativas da América Latina, para fins de introdução em regiões onde estas se tornaram invasoras. Isso se deve à grande importância, como plantas daninhas, que muitas espécies nativas da América Latina, inclusive do Brasil, têm em escala mundial (Ex: *Eichhornia crassipes* – o aguapé, considerada a pior planta invasora de ecossistemas dulcícolas em todo o mundo; *Lantana camara* – o cambará, listada comumente como uma das dez principais invasoras do mundo; *Miconia calvescens* – conhecida na Polinésia Francesa como “câncer verde”, e temida em ilhas do Pacífico como a pior ameaça às florestas nativas; *Psidium cattleianum* – o araçá, considerada a pior invasora de ilhas oceânicas como as do Arquipélago Havaiano e das Ilhas Maurícias).

Dois fitopatógenos, originários do Brasil, foram introduzidos em regiões diferentes do mundo para o controle biológico clássico, como resultado de parte destes trabalhos: *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *miconiae*, introduzido no Havai para o controle de *Miconia calvescens*; e *Prospodium tuberculatum*, introduzido na Austrália para o controle biológico de *Lantana camara* (Barreto *et al.* 1995, Meyer & Killgore, 2000, Killgore *et al.*, 1999, Meyer *et al.*, 2008). Existem ainda, na Universidade Federal de Viçosa outros trabalhos em cooperação, envolvendo o uso de fitopatógenos para o controle de plantas daninhas brasileiras em ambientes exóticos, como a cooperação com Landcare Research (Nova Zelândia) para o controle de *Tradescantia fluminensi* e com o USDA (EUA) para o controle de *Schinus terebinthifolius*.

Graças à cooperação entre cientistas e instituições de regiões invadidas por estas plantas e do Brasil, recursos foram aportados, laboratórios organizados e pesquisadores brasileiros treinados no campo do controle biológico de plantas daninhas. Passados mais de dez anos desde que o início dos trabalhos de grupos em cooperação internacional em controle biológico clássico de plantas daninhas há exemplos de programas que começaram a ser organizados ou planejados com a intenção de incluir o Brasil na lista de nações mundiais que se beneficiam da importação de agentes de biocontrole de plantas daninhas. Dentre os exemplos de plantas-alvo escolhidas para estes programas estão, além de *Hedychium coronarium*, as seguintes espécies: *Tecoma stans* – amarelinho (Vitorino *et al.*, 2004); *Cryptostegia madagascariensis* – unha-do-diabo (Barreto, 2008); e *Eragrostis plana* – capim-anoni (Nachtigal, com. pess.).

Em relação à estratégia inundativa houve um início promissor no Brasil, com os trabalhos pioneiros desenvolvidos na Embrapa Soja na década de 1980 visando ao controle do leiteiro ou amendoim-bravo (*Euphorbia heterophylla*) com o fungo *Bipolaris euphorbiae* (Yorinori 1985, 1987). Estes trabalhos foram posteriormente interrompidos por questões de mudança de prioridades de pesquisa na Embrapa, por limitações verificadas para os isolados disponíveis de *Bipolaris euphorbiae* e pelo temporário fechamento de mercado devido ao lançamento pela indústria de herbicidas com boa ação contra *Euphorbia heterophylla*. Entretanto, a planta ganhou novamente importância pela ampla ocorrência de populações resistentes a estes herbicidas.

Posteriormente, diversos outros trabalhos de investigação foram conduzidos, destacando-se o micoherbicida desenvolvido com base no fungo identificado originalmente como *Fusarium graminearum* na Unesp Jaboticabal (Borges Neto *et al.*, 2005; Borges Neto & Pitelli, 2004; Borges Neto *et al.*, 2004), para o controle da planta aquática *Egeria densa*, e o baseado no fungo *Lewia chlamidosporiformans*, para o controle de *Euphorbia heterophylla* desenvolvido na Universidade Federal de Viçosa. O desenvolvimento deste último produto é resultado de uma pesquisa iniciada há 20 anos e que envolveu o levantamento detalhado da micobiota brasileira de *Euphorbia heterophylla* (Barreto & Evans, 1998), a descoberta e descrição do fungo (Vieira & Barreto, 2005), estudos básicos de sua biologia e interação com a planta (dados não publicados), estudos de produção massal (Vieira *et al.*, 2008) e experimentos e testes demonstrativos que culminaram no desenvolvimento de um produto com patente requerida e que está em fase de testes para registro.

Passados mais de 30 anos das primeiras experiências demonstrando o uso de fitopatógenos como um recurso eficaz para o manejo de plantas daninhas e a mitigação dos problemas ambientais e econômicos por elas causados, esta aplicação continua rotulada como “método alternativo” e, em geral, considerada apenas como um último recurso para resolver os problemas com plantas daninhas. No entanto, a emergência de novos problemas tais como as crescentes infestações em áreas agrícolas por populações de plantas daninhas resistentes a herbicidas, os custos crescentes do controle químico, o impacto ambiental da aplicação em larga escala de herbicidas químicos, a ampliação das invasões biológicas por plantas exóticas que ameaçam o equilíbrio biológico e a continuação da existência de ecossistemas únicos no planeta, criou um cenário onde restam poucas opções para a mitigação ou solução destes problemas com métodos convencionais. É inevitável, então, que a importância do controle biológico de plantas daninhas, e particularmente a aplicação de fitopatógenos como agentes de biocontrole, seja elevada progressivamente e os benefícios para o manejo sustentável de ecossistemas (Barreto & Evans, 1996a) advindo de aplicações bem sucedidas deste método, finalmente sejam reconhecidos.

## Referências

- Adams, E.B. Fungi in classical biocontrol of weeds. In: Burges, M.N. (Ed.) Fungi in Biological Control Systems. Manchester. Manchester University Press. 1988. pp. 111-124.
- Akobundu, O. Weed Science in the Tropics, Principles and Practices. Chichester. John Wiley & Sons. 1987.
- Auld, B.A. & Morin, L. Constraints in the development of bioherbicides. *Weed Technology* 9: 638-652. 1995.
- Ayres, P. & Paul, N. Weeding with fungi. *New Scientist* 1732: 36-39. 1990.
- Barreto, R.W. Latin American weed biological control science at the crossroads. In: Julien, M.H.; Sforza, R.S.; Bon, M.C.; Evans, H.C.; Hatcher, P.E.; Hinz, H.L. & Rector, B.G. (Eds.) Proceedings of the XII International Symposium on Biological Control of Weed,. Wallingford. 2008. pp. 109-121.
- Barreto, R.W. & Evans, H.C. The mycobiota of the weed *Chromolaena odorata* in southern Brazil with particular reference to fungal pathogens for biological control. *Mycological Research* 98: 1107-1116. 1994.
- Barreto, R.W. & Evans, H.C. The mycobiota of the weed *Mikania micrantha* in southern Brazil with particular reference to fungal pathogens for biological control. *Mycological Research* 99: 343-352. 1995a.
- Barreto, R.W. & Evans, H.C. Mycobiota of the weed *Cyperus rotundus* in the state of Rio de Janeiro, with an elucidation of its associated *Puccinia* complex. *Mycological Research* 99: 407-419. 1995b.
- Barreto, R.W. & Evans, H.C. Fungal biocontrol of weeds and its potential role in ecosystem sustainability. In: Chapela, H.I. & Palm, M.E. (Eds.) Mycology in Sustainable Development: Expanding Concepts and Vanishing Borders. Boone. Parkway Publishers 1996a.
- Barreto, R.W. & Evans, H.C. Fungal pathogens of weeds collected in the Brazilian tropics and subtropics and their biocontrol potential. In: Delfosse, E.S. & Scott, R.R. (Eds.) Proceedings of the 8th International Symposium on Biological Control of Weeds, Melbourne. 1996 b.
- Barreto, R. W. & Evans, H.C. Fungal pathogens of *Euphorbia heterophylla* and *E. hirta* in Brazil and their potential as weed biocontrol agents. *Mycopathologia* 141: 21-36. 1998.
- Barreto, R.W.; Evans, H.C. & Ellison, C.A. The mycobiota of the weed *Lantana camara* in Brazil, with particular reference to biological control. *Mycological Research* 99: 769-782. 1995.
- Barton, J. How good are we at predicting the field host-range of fungal pathogens used for classical biological control of weeds? *Biological Control* 31: 99-122. 2004.



- Barton, J. Bioherbicides: All in a day's work ... for a superhero. What's New in Biological Control of Weeds? Landcare Research New Zealand. pp. 4-6. Disponível em: <http://www.landcareresearch.co.nz/publications/newsletters/weeds/wtsnew34.pdf>. Acesso em: 2005.
- Baruch, Z.; Pattinson, R.R. & Goldstein, G. Responses to light and water availability of four invasive Melastomataceae in the Hawaiian islands. *International Journal of Plant Science* 161: 107-118. 2000.
- Baudoin, A.B.A.M.; Abad, R.G.; Kok, L.T. & Bruckart, W.L. Field evaluation of *Puccinia carduorum* for biological control of musk thistle. *Biological Control* 3: 53-60. 1993.
- Borges Neto, C.R. & Pitelli, R.A. Adjuvantes e herbicidas e a infectividade de *Fusarium graminearum*, agente potencial de biocontrole de *Egeria densa* e *Egeria najas*. *Planta Daninha* 22: 77-83. 2004.
- Borges Neto, C.R.; Pitelli, R.A. & Gorgati, C.Q. Influência do fotoperíodo e da temperatura na intensidade de doença causada por *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *E. najas*. *Fitopatologia Brasileira* 29: 252-258. 2004.
- Borges Neto, C.R.; Gorgati, C.Q. & Pitelli, R. A. Influência do fotoperíodo e da temperatura na intensidade de doença causado por *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *Egeria najas*. *Planta Daninha* 23: 449-456. 2005.
- Bruckart III, W.L. Supplemental risk evaluations and status of *Puccinia carduorum* for biological control of musk thistle. *Biological Control* 32: 348-355. 2005.
- Bruzzese, E. & Hasan, S. Host specificity of the rust *Phragmidium violaceum*, a potential control agent of European blackberry. *Annals of Applied Biology* 108: 585-596. 1986.
- Burdon, J.J. & Thrall, P.H. Biological control of slender thistles using an introduced rust fungus. Centre for Plant Biodiversity Research and CRC for Weed Management Systems, Canberra, Australia. Disponível em: <http://www.weeds.asn.au/bio/carduus>. Acesso em: 2002.
- CDDFA. Disponível em: <http://www.cdfa.ca.gov/phpps/ipc/biocontrol/84ystrust.htm>. Acesso em: 9 Jun. 2008.
- Charudattan, R. The mycoherbicide approach with plant pathogens: In: TeBeest, D.O. (Ed.) *Microbial Control of Weeds*. New York. Chapman & Hall. 1991. pp. 24-57.
- Charudattan, R. Ecological, practical, and political inputs into selection of weed targets: What makes a good biological control target? *Biological Control* 35:183-196. 2005.
- Charudattan, R.; Pettersen, M.S. & Hiebert, E. Use of an inoculation suspension comprising tobacco mild green mosaic virus to induce lethal hypersensitive response in tropical soda apple plants. US Patent number US2004162220-A1. 2004.
- Conway, K.E. & Freeman, T.E. Host specificity of *Cercospora rodmanii*, a potential biological control agent of water hyacinth. *Plant Disease Reporter* 61: 262-266. 1977.
- Cronk, Q.C.B. & Fuller, J.L. *Plant Invaders*. New York. Chapman & Hall. 1995.
- Cullen, J.M. Prediction and practice in biological control. In: Richardson, R.G. (Ed.) *Proceedings of the First International Weed Control Congress*. Vol. 2. Melbourne. Monash University. 1992. pp. 137-140.
- Cullen, J.M. & Hasan, S. Pathogens for the control of weeds. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 318: 213-224. 1988.
- Cullen, J.M.; Kable, P.F. & Catt, M. Epidemic spread of a rust imported for biological control. *Nature* 244: 462-464. 1973.
- Daniel, J. T.; Templeton, G.E.; Smith, R. J. & Fox, W.T. Biological control of northern jointvech in rice with an endemic fungal disease. *Weed Science* 21: 303-307. 1973.
- De Jong, M.D. The BioChon story: deployment of *Chondrostereum purpureum* to suppress stump sprouting in hardwoods. *Mycologist* 14: 58-62. 2000.
- Den Breeyen, A. Release strategies for the establishment of the leaf spot pathogen, *Mycovellosiella lantanae* var. *lantanae*, on *Lantana camara* in South Africa In: Cullen, J.M.; Briese, D.T.; Kriticos, D.J.; Lonsdale, W.M.; Morin, L. & Scott, J.K. (Eds.) *Proceedings of the XI International Symposium on Biological Control of Weeds*. Canberra. 2004. pp. 386-388.
- Den Breeyen, A. & Morris, M.J. Pathogenicity and host specificity of *Mycovellosiella lantanae* var. *lantanae*, a potential biocontrol agent for *Lantana camara* in South Africa. *Biocontrol Science and Technology* 13: 313-322. 2003.
- Dhileepan, K.; Florentine, S.K. & Lockett, C.J. Establishment, initial impact and persistence of parthenium summer rust *Puccinia melampodii* in Northern Queensland. In: Preston, C.; Watts, J.H. & Crossman, N.D. (Eds.) *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Australian Weeds Conference*, Melbourne. 2006. pp. 577-580.

- Duke, S.O. & Lydon, J. Natural phytotoxins as herbicides. In: Duke, S. O. (Ed.) Pest Control with Enhanced Environmental Safety. Washington. American Chemical Society. 1993. pp. 110-124.
- Ellison, C.A. & Barreto, R.W. Classical biological control of weeds with fungal pathogens: a Latin American perspective. *Biological Invasions* 6: 23-45. 2004.
- Ellison, C.A.; Evans, H.C.; Djeddour, D.H. & Thomas, S.E. Biology and host range of the rust fungus *Puccinia spegazzinii*: A new classical biological control agent for the invasive, alien weed *Mikania micrantha* in Asia. *Biological Control* 45: 133-145. 2008.
- Emge, R.G.; Melching, J.S. & Kingsolver, C.H. Epidemiology of *Puccinia chondrillina*, a rust pathogen for the biological control of rush skeleton weed in the United States. *Phytopathology* 71: 839-843. 1981.
- Evans, H.C. Evaluating plant pathogens for biological control of weeds: an alternative view of pest risk assessment. *Australasian Plant Pathology* 29:1-14. 2000.
- Evans, H.C. & Ellison, C.A. Classical biological control of weeds with microorganisms: past, present, prospects. *Aspects of Applied Biology* 24: 39-49. 1990.
- Evans, H.C.; Greaves, M.P. & Watson, A.K. Fungal biocontrol agents of weeds. In: Butt, T.M.; Jackson, C. & Magan, N. (Eds.) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. Wallingford. CABI Publishing. 2001. pp.169-192.
- Evans, K.J.; Morin, L.; Bruzese, E. & Roush, R.T. Overcoming limits on rust epidemics in Australian infestations of European blackberry. In: Cullen, J.M.; Briese, D.T.; Kriticos, D.J.; Lonsdale, W.M.; Morin, L. & Scott, J.K. (Eds.) *Proceedings of the XI. International Symposium on Biological Control of Weeds*, Canberra. 2004. p. 514.
- Farrell G. & Lonsdale M. Measuring the impact of biological control agents on weeds. In: Julien, M. & White, G. (Eds.) *Biological Control of Weeds: Theory and practical application*. Canberra. ACIAR. 1997. pp. 105-118.
- Figueiredo, G. Herbicidas microbiológicos empregados no controle de plantas daninhas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 3: 111-132. 1995.
- Fisher, A.J.; Woods, D.M.; Smith, L. & Bruckart, W.L. Developing an optimal release strategy for the rust fungus *Puccinia jaceae* var. *solstitialis* for biological control of *Centaurea solstitialis* (yellow starthistle). *Biological Control* 42: 161-171. 2007.
- Fletcher, W.W. Introduction. In: Fletcher, W.W. (Ed.) *Recent Advances in Weed Research*. Slough. CAB Publications. 1983. pp. 1-2.
- Forno, W. Procedures in biological control of weeds. In: Julien, M. & White, G. (Eds.) *Biological Control of Weeds: Theory and practical application*. Canberra. ACIAR. 1997. pp. 47-49.
- Forno, W.; Seier, M.; Chakraborty, S.; Weinert, M. & Hennecke, B. Release of the fungus *Sphaerulina mimosae-pigrae* (*Phloeospora mimosae-pigrae*), in Australia for biological control of giant sensitive plant, *Mimosa pigra*. In: Moran, V.C. & Hoffman, J.H. (Eds.) *Proceedings of the IX. International Symposium on Biological Control of Weeds* Cape Town. University of Cape Town. 1996. p. 334.
- Fröhlich, J.; Fowler, S.V.; Gianotti, A.F.; Hill, R.L.; Killgore, E.M.; Morin, L.; Sugiyama, L.S. & Winks, C. Biological control of mist flower (*Ageratina riparia*, Asteraceae) in New Zealand. In: Callaghan, M. (Ed.) *Proceedings of the 52nd New Zealand Plant Protection Conference*. Auckland. The New Zealand Plant Protection Society. 1999. pp. 6-11.
- Gardner, D.E.; Killgore, E.M.; Sugiyama, L.S. & Anderson, R.C. Current biocontrol research in the Hawaii Department of Agriculture plant pathogen containment facility. In: Moran, V.C. & Hoffmann, J.H. (Eds.) *Proceedings of the IX. International Symposium on Biological Control of Weeds*. Cape Town. University of Cape Town. 1996. p. 229.
- Gardner, D.E.; Anderson, R.C.; Killgore, E.M. & Sugiyama, L.S. Host range evaluation of *Septoria hodgesii* as a biocontrol agent for Fayatree. *Newsletter. Hawaiian Botanical Society* 38: 3-4. 1999.
- Ghosheh, H.Z. Constraints in implementing biological weed control: a review. *Weed Biology and Management* 5: 83-92. 2005.
- Gourlay, A.; Wittenberg, H.R.; Hill, R.L.; Spiers, A.G. & Fowler, S.V. The Biological Control Programme against *Clematis vitalba* in New Zealand. In: Spencer, N.R. (Ed.) *Proceedings of the X. International Symposium on Biological Control of Weeds*. Montana. 2000. pp. 709-718.
- Hallett, S.G. Where are the bioherbicides? *Weed Science* 53: 404-415. 2005.

- Harley, K.W.S. & Forno, I.W. *Biological Control of Weeds – A Handbook for Practitioners and Students*. Melbourne. Inkata Press. 1992.
- Harris, P. The selection of effective agents for the biological control of weeds. *Canadian Entomologist* 105:1495-1503. 1973.
- Hasan, S. Specificity and host specialization of *Puccinia chondrillina*. *Annals of Applied Biology* 72: 257-263. 1972.
- Hasan, S. Recent advances in the use of plant pathogens as biocontrol agents of weeds. *Pest Articles and News Sumaries* 20: 437-443. 1974.
- Hasan, S. Plant pathogens and biological control of weeds. *Review of Plant Pathology* 59: 349-355. 1980.
- Hasan, S.; Delfosse, E.S.; Aracil, E. & Lewis, R.C. Host specificity of *Uromyces heliotropii*, a fungal agent for the biological control, of common heliotrope (*Heliotropium europaeum*) in Australia. *Annals of Applied. Biology* 121: 697-705. 1992.
- Hasan, S.; Delfosse, E.S.; Aracil, E. & Lewis, R.C. Host specificity of *Uromyces heliotropii*, a fungal agent for the biological control of common heliotrope, *Heliotropium europaeum*, in Australia. In: Delfosse, E.S. & Scott, R.R. (Eds.) *Proceedings of the VIII. International Symposium on Biological Control of Weeds.*, Melbourne. DSIR/CSIRO. 1995. p. 47.
- Heap, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. Disponível em: [www.weedscience.com](http://www.weedscience.com) Acesso em: 25 nov. 2008.
- Heywood, B.J. New herbicides. In: Fletcher, W. W. (Ed.) *Recent Advances in Weed Research*. Slough. CAB. 1983. pp. 105-120.
- Hoffmann, J.H. Interactions between three weevil species in the biocontrol of *Sesbania punicea* (Fabaceae): the role of simulation models in evaluation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 32: 77-87. 1990.
- Huffaker, C.B. An overview of biological control, with particular commentary on biological weed control. In: Freeman, T.E. (Ed.) *Proceedings of the 4th International Symposium on Biological Control of Weeds*. Gainesville. University of Florida. 1976. pp. 3-10.
- Imaizumi, S.; Nishino, T.; Miyabe, K.; Fujimori, T. & Yamada, M. Biological control of annual bluegrass (*Poa annua* L.) with a Japanese isolate of *Xanthomonas campestris* pv. *poae* (JT-P482). *Biological Control* 8: 7-14. 1997
- IUCN Fifth Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity (Nairobi, Kenya 15-26 May 2000). IUCN Information Paper: 1-21. 2000
- Julien, M.H. Biological control of weeds worldwide: trends, rates of success and the future. *Biocontrol News and Information* 10: 299-306. 1989.
- Julien, M. & Griffiths, M.W. *Biological Control of Weeds – A World Catalogue of Agents and their Target Weeds*. Wallingford. CABI Publishing. 1998.
- Julien, M. & White, G. *Biological Control of Weeds: Theory and practical application*. ACIAR Monograph 49: 1-192. 1997.
- Jutsum, A.R. Commercial application of biological control: status and prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 318: 357-373. 1988.
- Kenney, D.S. Devine - the way it was developed - an industrialist view. *Weed Science* 34: 15-16. 1986.
- Kiely, T.; Donaldson, D. & Grube, A. *Pesticide Industry Sales and Usage: 2000 and 2001 Market Estimates*. Washington, D.C. U.S. Environmental Protection Agency. 2004.
- Killgore, E.M.; Sugiyama, L.S.; Barreto, R.W. & Gardner, D.E. Evaluation of *Colletotrichum gloeosporioides* for biological control of *Miconia calvescens* in Hawaii. *Plant Disease* 83: 964. 1999.
- Lawton, J.H. Ecological theory and choice of biological control agents. In: Delfosse, E. S. (Ed.) *Proceedings of the VI. International Symposium on Biological Control of Weeds*. Ottawa. Canadian Government Publication Centre. 1984. pp. 13-26.
- Lennox, C.L.; Morris, M.J.; Van Rooi, C.; Serdani, M.; Wood, A.R.; Den Breeÿen, A.; Markram, J.L. & Samuels, G. A decade of biological control of *Acacia saligna* in South Africa, using the gall rust fungus, *Uromycladium tepperianum*. In: Cullen, J.M.; Brieese, D.T.; Kriticos, D.J.; Lonsdale, W.M.; Morin, L. & Scott, J.K. (Eds.) *Proceedings of the XI. International Symposium on Biological Control of Weeds*. Camberra. CSIRO. 2004. pp. 574-575.
- Lorenzi, H. *Plantas Daninhas no Brasil*. Nova Odessa. Editora Plantarum. 2000.
- Mack, R.N.; Simberloff, D.; Lonsdale, W.M.; Evans, H.; Clout, M. & Bazzaz, F.A. Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences and control. *Ecological Applications* 10: 689-710. 2000.

- McFadyen, R.E.C. & Willson, B. A history of biological control of weeds. In: Julien, M. & White, G. Biological control of weeds: theory and practical applications. Canberra. ACIAR. 1997. pp. 17-22.
- McFadyen, R.E.C. Biological control of weeds. Annual Review of Entomology 43: 369-393. 1998.
- McNeil, J. Problems of weed taxonomy. In: Holzner, W. & Numata, M. (Eds.) Biology and Ecology of Weeds. The Hague. Dr. Junk Publishers. 1982. pp. 5-27.
- Meyer, J.Y.; Taputuarai, R. & Killgore, E. Dissemination and impacts of the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *miconiae* (Deuteromycetinae) on the invasive alien tree *Miconia calvenscens* (Melastomataceae) in the rainforests of Tahiti (French Polynesia, South Pacific). In: Julien, M.H.; Sforza, R.S.; Bon, M.C.; Evans, H.C.; Hatcher, P.E.; Hinz, H.L. & Rector, B.G. (Eds.). Proceedings of the XII. International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford. CABI. 2008. pp. 594-600.
- Meyer, J-Y. & Killgore, E.M. First and successful release of a bio-control pathogen agent to combat the invasive alien tree *Miconia calvenscens* (Melastomataceae) in Tahiti. Aliens. Newsletter of the Invasive Species Specialist Group of the IUCN Species Survival Commission 12: 8. 2000.
- Morin, L.; Hill, R.L. & Matayoshi, S. Hawaii's successful biological control strategy for mist flower (*Ageratina riparia*)— can it be transferred to New Zealand? Biocontrol News and Information 18: 77N-88N. 1997.
- Morin, L.; Armstrong, J.; Wanjura, W.; Driver, F. & Kriticos, D. Compatible interactions between the pathogen, weed and environment make the bridal creeper rust a successful biological control agent. In: Cullen, J.M.; Briese, D.T.; Kriticos, D.J.; Lonsdale, W.M.; Morin, L. & Scott, J.K. (Eds.) Proceedings of the XI. International Symposium on Biological Control of Weeds. Canberra. CSIRO. 2004. pp. 226-227.
- Morin, L.; Neave, M.; Batchelor, K.L. & Reid, A. Biological control: a promising tool for managing bridal creeper in Australia. Plant Protection Quarterly 21: 69-77. 2006.
- Morin, L.; Willis, A.J.; Armstrong, J. & Kriticos, D. Spread, epidemic development and impact of the bridal creeper rust in Australia: summary of results. In: Spafford Jacob, H.; Dodd, J. & Moore, J.H. (Eds.) Proceedings of the 13th Australian Weeds Conference. Perth. Australia. Plant Protection Society of WA. 2002. pp. 385-388.
- Morris, M.J. Biology of the Acacia gall rust, *Uromycladium tepperianum*. Plant Pathology 36: 100-106. 1987.
- Morris, M.J. Host specificity studies of a leaf spot fungus, *Phaeoramularia* sp., for the biological control of crofton weed (*Ageratina adenophora*) in South Africa. Phytophylactica 21: 281-283. 1989.
- Morris, M.J.; Wood, A.R. & Den Breeÿen, A. Plant pathogens and biological control of weeds in South Africa: a review of projects and progress during the last decade. African Entomological Memoir 1: 129-137. 1999.
- Mortensen, K. Biological control of weeds with plant pathogens. Canadian Journal of Plant Pathology 8: 229-231. 1986.
- Mortensen, K. The potential of an endemic fungus, *Colletotrichum gloeosporioides*, for biological control of round leaf mallow (*Malva pusilla*) and velvetleaf (*Abutilon theophrasti*). Weed Science 36: 473-478. 1988.
- Oehrens, E. Posibilidades de introducción de hongos uredinales como factores de control biológico para malezas dicotiledóneas de Chile. Simiente 23: 17. 1963.
- Oehrens, E. Biological control of blackberry through the introduction of the rust, *Phragmidium violaceum*, in Chile. FAO Plant Protection Bulletin 25: 26-28. 1977.
- Oehrens, E. & Gonzalez, S. Introducción de *Uromyces galegae* (Opiz) Saccardo como factor de control biológico de alega (*Galega officinalis* L.). Agro Sur 3: 87-91. 1975.
- Parker, A.; Holdern, A.N.G. & Tomley, A.J. Host specificity testing and assessment of the pathogenicity of the rust, *Puccinia abrupta* var. *partheniicola*, as a biological control agent of Parthenium weed (*Parthenium hysterophorus*). Plant Pathology 43: 1-16. 1994.
- Parker, C. & Fryer, J.D. Weed control problems causing major reductions in world food supplies. FAO Plant Protection Bulletin 23: 83-95. 1975.
- Parker, P. Nematodes as biological control agents of weeds. In: TeBeest, D. O. (Ed.) Microbial Control of Weeds. New York. Chapman and Hall. 1991. pp. 58-68.
- Pereira, J. M. & Barreto, R. W. Additions to the mycobiota of the weed Lantana camara (Verbenaceae) in Southeastern Brazil. Mycopathologia 151: 71-80. 2000.

- Pereira, O.L. & Barreto, R.W. The mycobiota of the weed *Mitracarpus hirtus* in Minas Gerais (Brazil), with particular reference to fungal pathogens for biological control. *Australasian Plant Pathology* 34: 41-50. 2005.
- Pereira, O.L. & Barreto, R.W. *Pseudocercospora palicoureae* sp. nov. associated with the toxic rubiaceous weed *Palicourea marcgravii* in Brazil, with observations on its mycobiota. *Fungal Diversity* 23: 243-253. 2006.
- Pereira, O.L.; Barreto, R.W.; Cavalazzi, J.R.P. & Braun, U. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. *Fungal Diversity* 25: 167-180. 2007.
- Perkins, R.C.L. & Swezey, O.H. The introduction into Hawaii of insects that attack lantana. Experimental Station. Hawaiian Sugar Planters Association Bulletin 16, Honolulu. 1924.
- Poirier, C.; Gottlieb, A.R.; Watson, A.K. & Wymore, L. *Colletotrichum coccodes*, a mycoherbicide for velvetleaf. In: Delfosse, E. S. (Ed.) Proceedings of the 6th International Symposium on Biological Control of Weeds. Vancouver. Agriculture Canada. 1985. p. 651.
- Politis, D.J.; Watson, A.K. & Bruckart, W.L. Susceptibility of musk thistle and related composites to *Puccinia carduorum*. *Phytopathology* 74: 687-691. 1984.
- Pomella, A.W.V. & Barreto, R.W. *Phaeotrichoconis crotalarie*, um novo fitopatógeno associado à *Cyperus rotundus* (tiririca). *Fitopatologia Brasileira* 20: 367. 1995.
- Pomella, A.W.V. & Barreto, R.W. Leaf scorch of purple nutsedge (*Cyperus rotundus*) caused by *Ascochyta cyperiphthora*. *Mycotaxon* 65: 459-468. 1997.
- Ridings, W.H.; Mitchell, D.J.; Schoulties, C.L. & El-Gholl, N.E. Biological control of milkweed vine in Florida citrus groves with a pathotype of *Phytophthora citrophthora*. In: Freeman, T.E. (Ed.) Proceedings of the 4th International Symposium on Biological Control of Weeds. Gainesville. University of Florida. 1974. pp. 224-240.
- Robinson, A.F.; Orr, C.C. & Abernathy, J.R. Distribution of *Nothanguina phyllobia* and its potential control agent for Silver-leaf Nightshade. *Journal of Nematology* 10: 362-366. 1978.
- Samuel, E. Is there a safe limit for weedkillers? *New Scientist* 2361:10. 2002.
- Sankaran, K.V.; Puzari, K.C.; Ellison, C.A.; Kumar, P.S. & Dev, U. Field release of the rust fungus *Puccinia spegazzinii* to control *Mikania micrantha* in India. In: Julien, M.H.; Sforza, R.S.; Bon, M.C.; Evans, H.C.; Hatcher, P.E.; Hinz, H.L. & Rector, B.G. (Eds.). Proceedings of the XII. International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford. CABI. 2008. pp 384-389.
- Schroeder, D. Biological control of weeds. In: Fletcher, W. W. (Ed.) Recent Advances in Weed Research. Slough. CAB. 1983. pp. 42-78.
- Seier, M.K. & Evans, H.C. Two fungal pathogens of *Mimosa pigra* var. *pigra* from Mexico: the finishing touch for biological control of this weed in Australia? In: Moran, V.C. & Hoffman, J.H. (Eds.) Proceedings of the IX. International Symposium on Biological Control of Weeds. Cape Town. University of Cape Town. 1996. pp. 87-92.
- Seixas, C.D.S.; Barreto, R.W.; Freitas, L.G.; Monteiro, F.T. & Oliveira, R.D.L. *Ditylenchus drepanocercus* rediscovered in the Neotropics causing angular leaf spots on *Miconia calvenscens*. *Journal of Nematology* 36: 481-486. 2004a.
- Seixas, C.D.S.; Barreto, R.W.; Freitas, L.G.; Maffia, L.A. & Monteiro, F.T. *Ditylenchus drepanocercus* (Nematoda), a potential biological control agent for *Miconia calvenscens* (Melastomataceae): host-specificity and epidemiology. *Biological Control* 31: 29-37. 2004b.
- Seixas, C.D.S.; Barreto, R.W. & Killgore, E. Fungal pathogens of *Miconia calvenscens* (Melastomataceae) from Brazil, with reference to classical biological control. *Mycologia* 99: 99-111. 2007.
- Soares, D.J. & Barreto, R.W. Fungal pathogens of the invasive riparian weed *Hedychium coronarium* from Brazil and their potential for biological control. *Fungal Diversity* 28: 85-96. 2008.
- Supkoff, D.M.; Joley, D.B. & Marois, J.J. Effect of introduced biological control organisms on the density of *Chondrilla juncea* in California. *Journal of Applied Ecology* 25: 1089-1095. 1988.
- Tebeest, D.O. Biological control of weeds with microbial herbicides. *Fitopatologia Brasileira* 9: 443-453. 1984.
- Tebeest, D.O.; Yang, X.B. & Cisar, C. R. The status of biological control of weeds with fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 30: 637-657. 1992.
- Templeton, G.E. Status of weed control with plant pathogens. In: Charudattan, R. & Walker, H.L. (Eds.) *Biological Control of Weeds with Plant Pathogens*. New York. John Wiley & Sons. 1982. pp. 29-44.

- Templeton, G.E. Biological control of weeds with fungal pathogens. *Tropical Pest Management* 30: 333-338. 1984.
- Tomley, A.J. & Evans, H.C. Establishment of, and preliminary impact studies on, the rust, *Maravalia cryptostegiae*, of the invasive alien weed, *Cryptostegia grandiflora* in Queensland, Australia. *Plant Pathology* 53: 475-484. 2004.
- Tomley, A.J. & Riding, N. *Prospodium tuberculatum*, lantana rust, a new agent released for the biocontrol of the woody shrub *Lantana camara*. In: Spafford Jacob, H.; Dodd, J. & Moore, J.H. (Eds.) Proceedings of the 13th Australian Weeds Conference. Perth. Plant Protection Society of WA. 2002. pp. 385-388.
- Tomley, A.J. & Willsher, L. Field release and initial impact of groundsel bush rust in Australia. In: Julien, M.H.; Sforza, R.; Bon, M.C.; Evans, H.C.; Hatcher, P.E.; Hinz, H.L. & Rector, B.G. (Eds.) Proceedings of the XII. International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford. CAB International. 2002. pp. 391-393.
- Trujillo, E.E. History and success of plant pathogens for biological control of introduced weeds in Hawaii. *Biological Control* 33: 113-122. 2005.
- Trujillo, E.E. & Norman, D.J. *Septoria* leaf spot of lantana from Ecuador: a potential biological control for bush lantana in forests of Hawaii. *Plant Disease* 79: 819-821. 1995.
- Trujillo, E.E.; Latterell, F.M. & Rossi, A.E. *Colletotrichum gloeosporioides*, a possible biological control agent for *Clidemia hirta* in Hawaiian forests. *Plant Disease* 70: 974-976. 1986.
- Trujillo, E.E.; Norman, D.J. & Killgore, E.M. *Septoria* leaf spot, a potential biological control for banana poka vine in forests of Hawaii. *Plant Disease* 78: 883-885. 1994.
- Verma, U.; Charudattan, R.; Devalerio, J.T. & Tomley, A.J. *Puccinia evadens*, a biological control agent for *Baccharis halimifolia*. In: Moran, V.C. & Hoffmann, J.H. (Eds.) Proceedings of the IX. International Symposium on Biological Control of Weeds. Cape Town. University of Cape Town Press. 1996. p. 234.
- Vieira, B.S. & Barreto, R.W. *Lewia chlamidosporiformans* sp. nov. from *Euphorbia heterophylla*. *Mycotaxon* 94: 245-248. 2005.
- Vieira, B.S.; Nechet, K.L. & Barreto, R.W. *Lewia chlamidosporiformans*, a mycoherbicide for control of *Euphorbia heterophylla*: isolate selection and mass production. In: Julien, M.H.; Sforza, R.S.; Bon, M.C.; Evans, H.C.; Hatcher, P.E.; Hinz, H.L. & Rector, B.G. (Eds.) Proceedings of the XII. International Symposium on Biological Control of Weeds. Wallingford. CABI. 2008. pp. 206-210.
- Vitorino, M.D.; Pedrosa-Macedo, J.H.; Menezes Jr., A.O.; Andreazza, C.J.; Bredow, E.A. & Simões, H.C. Survey of potential biological agents to control yellow bells, *Tecoma stans* (L.) Kunth. (Bignoniaceae), in southern Brazil. In: Cullen, J.M.; Briese, D.T.; Kriticos, D.J.; Lonsdale, W.M.; Morin, L. & Scott, J.K. (Eds.) Proceedings of the XI. International Symposium on Biological Control of Weeds. Canberra. CSIRO. 2004. pp. 186-187.
- Vitousek, P.M. Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology* 75: 1861-1876. 1994.
- Wapshere, A.J. A strategy for evaluating the safety of organisms for biological weed control. *Annals of Applied Biology* 77: 201-211. 1974.
- Wapshere, A.J. Biological control of weeds. In: Holzner, W. & Numata, M. (Eds.) *Biology and Ecology of Weeds*. The Hague. Dr. Junk Publishers. 1982. pp. 47-56.
- Wapshere, A.J. Prospects for the biological control of silver-leaf nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, in Australia. *Australian Journal of Agricultural Research* 39: 187-197. 1988.
- Waterhouse, D.F.W. & Norris, K.R. *Biological Control Pacific Prospects*. Melbourne. Inkata Press. 1987.
- Watson, A.K. Biology of *Subanguina picridis*, a potential biological control agent of Russian knapweed. *Journal of Nematology* 18: 149-154. 1986.
- Watson, A.K. The classical approach with plant pathogens In: TeBeest, D. (Ed.) *Microbial Control of Weeds*. New York. Chapman and Hall. 1991. pp. 3-23.
- Wilson, C.L. Use of plant pathogens in weed control. *Annual Review of Plant Pathology* 7: 411-433. 1969.
- Yandoc-Ables, C.B.; Roskopf, E.N. & Charudattan, R. Plant pathogens at work: possibilities for weed biocontrol. APS net. Feature Story August 2006. Disponível em: <http://www.apsnet.org/online/feature/weed1>, e <http://www.apsnet.org/online/feature/weed2>.

- Yorinori, J.T. Biological control of milk weed (*Euphorbia heterophylla*) with pathogenic fungi. In: Delfosse, E.S. (Ed.) Proceedings of the 6th International Symposium on Biological Control of Weeds. Vancouver. Agriculture Canada. 1985. pp. 677-681.
- Yorinori, J.T. Controle biológico de ervas daninhas com microorganismos. Anais, II. Reunião sobre o Controle Biológico de Doenças de Plantas, Campinas, SP. Fundação Cargill. 1987. pp. 20-30.

## Capítulo 8

# Bioestimulantes e Protetores de Plantas Derivados de Macroalgas Marinhas

Viviane Talamini<sup>1</sup>, Roberta Paulert<sup>2</sup> & Marciel Stadnik<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Tabuleiros Costeiros, CP 44; 49025-040 Aracajú, SE, Brasil, e-mail: viviane@cpatc.embrapa.br. <sup>2</sup>Instituto de Bioquímica e Biotecnologia de Plantas, Universidade de Münster, Hindenburgplatz 55, D-48143, Alemanha. <sup>3</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil, e-mail: stadnik@cca.ufsc.br.

## Introdução

As macroalgas marinhas são organismos ricos em substâncias biologicamente ativas e ganham destaque como potenciais fontes de produtos para proteção de plantas contra patógenos. A maioria das espécies de macroalgas apresenta rápido crescimento com considerável produção de biomassa, sendo passíveis de serem cultivadas em tanques. Estas características facilitam a exploração comercial desses organismos para diversos fins, entre eles para uso como produtos fitossanitários naturais.

Do ponto de vista fitossanitário, os produtos obtidos das macroalgas podem apresentar três atividades principais: atividade direta contra fitopatógenos, pois inibem o crescimento micelial e a germinação de esporos fúngicos ou a multiplicação de bactérias e outros fitopatógenos; atividade indireta, atuando como indutores de resistência, pois contêm moléculas bioativas capazes de induzir ou ativar os mecanismos de defesa das plantas e/ou atuando no estímulo da população de antagonistas do solo; e bioestimulantes do crescimento das plantas. Além das substâncias bioativas, as macroalgas contêm nutrientes e compostos orgânicos como auxinas, giberelinas, precursores do etileno e betaínas, que podem atuar no crescimento das plantas (Wu *et al.*, 1997).



Diante da crescente demanda por produtos naturais para o controle de doenças de plantas, os trabalhos de bioprospecção buscando organismos marinhos e suas moléculas bioativas vêm se destacando no meio científico. Neste contexto, as macroalgas também apresentam potencial para a obtenção de substâncias de uso agrícola. Devido a isso, algumas espécies e produtos derivados já são comercializados em vários países como bioestimulantes e/ou fitoprotetores.

Neste capítulo serão abordados alguns resultados de pesquisas que buscam encontrar nas macroalgas marinhas moléculas bioativas ou outras substâncias que atuem na proteção de plantas contra fitopatógenos e/ou estimulem o crescimento das plantas.

## Macroalgas Marinhas com Atividade Direta

A atividade direta ou antibiose a partir de metabólitos de algas contra bactérias, fungos e nematóides fitopatogênicos é relatada em estudos prospectivos, e, moléculas bioativas são frequentemente identificadas em diferentes espécies de macroalgas. Vlachos *et al.* (1997) testaram o extrato etanólico de 56 espécies de algas coletadas nas costas leste e oeste da África do Sul e verificaram que o extrato da alga marrom *Zonaria subarticulata* mostrou o mais amplo e intenso espectro de atividade antimicrobiana. Abourriche *et al.* (1999) e Bennamara *et al.* (1999) identificaram na alga marrom *Cystoseira tamariscifolia* compostos bioativos, entre eles, o diterpenóide metoxifurcarenona, o qual mostrou forte atividade contra *Fusarium oxysporum* e *Verticillium albo-atrum* e contra a bactéria *Agrobacterium tumefaciens*. A partir da alga marrom (*Jolyana laminarioides*) isolou-se o fucosterol, que inibiu o crescimento de fungos (Rahman *et al.* 1997). Horikawa *et al.* (1996) isolaram três substâncias antibacterianas da alga vermelha *Laurencia okamurae* coletada na costa do Japão. Já König & Wright (1997) identificaram alolaurinterol a partir de uma espécie semelhante (*Laurencia obtusa*) que ocorre no Caribe. Esse composto apresentou atividade contra diversos fungos fitopatogênicos entre eles *Ustilago violacea* e *Fusarium oxysporum*. O extrato metanólico da macroalga *Ulva fasciata* inibiu a multiplicação da bactéria *Erwinia carotovora* (Paulert *et al.*, 2007).

A incorporação ao solo de *Sargassum wartzii*, juntamente com o antagonista *Paecilomyces lilacinus*, reduziu a infecção radicular causada por *Macrophomina phaseolina* e *Fusarium solani* em girassol, além de proporcionar maior peso fresco das plantas (Ara *et al.*, 1996). A aplicação no solo do extrato de *Ascophyllum nodosum* diminuiu o número de juvenis de segundo estágio e de ovos de *Meloidogyne* spp. em raízes de tomateiro, bem como a colonização de fêmeas de *Meloidogyne javanica* em raízes de *Arabidopsis thaliana* (Jenkins *et al.*, 1998). Extratos de *Spatoglossum schroederi*, *Botryocladia occidentalis* e *Bryothamnion triquestrum* são capazes de reduzir o número de galhas (*Meloidogyne* spp.) em raízes de tomateiro quando usados como condicionadores de solo (Paracer *et al.*, 1987). Tem-se discutido se a supressão dos nematóides resulta de uma ação tóxica direta ou se seria mediada por mudanças na fisiologia do hospedeiro.

Segundo Wu *et al.* (1997; 1998), os efeitos de extratos de *Ascophyllum nodosum* sobre *Meloidogyne incognita* e *Meloidogyne javanica* são devidos, provavelmente, à ação de betaínas presentes no extrato. As algas *Stokeyia indica*, *Padina pavonia* e *Solieria robusta* incorporadas ao solo a 1% (peso/peso) reduziram a infecção das raízes de *Abelmoschus esculentus* por *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* e ainda houve maior crescimento das plantas (Sultana *et al.*, 2005).

O extrato de *Hypnea musciformis* contendo aglutininas na fração protéica inibiu a germinação de *Colletotrichum lindemuthianum* (Melo *et al.*, 1997). O mecanismo antifúngico de ação deve-se provavelmente à ligação da aglutinina com a camada de quitina presente nas paredes celulares da hifa do fungo, o que inibiu o crescimento de novas hifas.

## Macroalgas Marinhas com Atividade Indireta

As macroalgas e seus extratos podem reduzir as doenças de plantas de forma indireta melhorando as condições físicas, químicas e/ou biológicas do solo ou induzindo resistência na planta tratada.

Alguns produtos a base de algas são comercializados como fertilizantes. Na Europa, estão disponíveis produtos à base de carbonato de cálcio obtidos da alga marinha calcárea *Lithothamnium calcareum* (por exemplo: Lithothamne®). Tais substâncias possuem um conteúdo rico em elementos minerais, principalmente cálcio e magnésio, e servem para otimizar o balanço físico-químico de solos ácidos e favorecer o ambiente para a microbiota do solo, deixando-o mais fértil (Roullier, 2008).

Alguns agricultores da região da cidade de Rio Grande (RS) utilizam algas dos gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* como adubo (Oliveira, 1981). Gestinari *et al.* (2002) compararam a eficiência da farinha seca de *Ulva* spp. e *Sargassum* spp. como adubo orgânico para hortaliças. Os melhores resultados foram obtidos com a utilização de *Ulva* especialmente no cultivo da salsa (*Petroselinum crispum*). No Peru, a compostagem de *Ulva* produz substâncias com baixos teores de nitrogênio e altos teores de ferro e manganês, que são utilizadas na agricultura (Wosnitza & Barrantes, 2005).

A aplicação de algas e/ou extratos pode provocar um revestimento das partículas do solo com polissacarídeos. Isso estimula o crescimento de bactérias e fungos saprófitas, que são antagonistas aos fitopatógenos veiculados pelo solo (Wilkie & Mulbry, 2002). Por exemplo, a aplicação preventiva de extrato líquido de algas (1%) no solo mostrou-se eficiente contra *Pythium ultimum* em *Brassica oleracea capitata* (Dixon & Walsh, 2004). Além disso, quando aplicados ao solo, extratos de algas podem estimular o crescimento de fungos micorrízicos. Extratos etanólicos de *Laminaria japonica* e *Undaria pinnatifida* estimularam o desenvolvimento de hifas e o crescimento vesicular-arbuscular de *Gigaspora ramisporophora* em raízes de plantas cítricas (Kuwada *et al.*, 1999).

Uma enorme variedade de compostos incluindo oligo- e polissacarídeos, proteínas e lipídeos podem atuar como protetores de plantas. Entre estas biomoléculas, destacam-se, até o momento, os polissacarídeos obtidos das macroalgas marinhas *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria digitata*, *Gigartina* sp., *Lessonia* sp., *Euchema* sp., *Fucus evanescens*, *Pelvetica canaliculata* e *Ulva* sp., que têm a capacidade de estimular resistência a uma ampla gama de fitopatógenos, incluindo vírus, bactérias e fungos (Cluzet *et al.*, 2004; Ménard *et al.*, 2004, 2005; Lapshina *et al.*, 2006; Laporte *et al.*, 2007).

O extrato da macroalga marrom *Ascophyllum nodosum* foi testado em pimenteira e em videira para controlar doenças causadas por *Phytophthora capsici* e *Plasmopara viticola*, respectivamente. Ambos os patógenos foram controlados com a pulverização foliar do extrato dessa espécie. Nos tecidos foliares de pimenteira, a atividade de peroxidase e a concentração da fitoalexina capsidiol foram significativamente incrementadas. Por isso, Lizzi *et al.* (1998) concluíram que o extrato de *Ascophyllum nodosum* atua como indutor de resistência.

Polissacarídeos complexos, sulfatados ou não, são comumente encontrados nas paredes celulares de algas, os quais podem apresentar diferentes formas de atividade biológica, tais como elicitação de respostas de defesa da planta (Cluzet *et al.*, 2004; Klarzynski *et al.*, 2000; Mercier *et al.*, 2001). Da alga marrom *Laminaria digitata* pode-se extrair a laminarana, um polímero de cadeia longa linear de  $\beta$ -1,3 glucana, que é capaz de estimular as reações de defesa da planta contra vários patógenos. Isso acontece porque a laminarana é um análogo de oligossacarídeos naturais envolvidos nos mecanismos de reconhecimento celular, nas interações planta-patógeno exógenas (resultantes da degradação das paredes celulares de fungos) ou endógenas (calose fragmentada no hospedeiro) (Klarzynski *et al.*, 2000). Reações de defesa elicítadas pela laminarana em células de videira incluem influxo de cálcio, alcalinização do meio extracelular, explosão oxidativa, ativação de proteína quinases, expressão de 10 genes relacionados à defesa da planta, aumento da atividade de quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase e a produção de fitoalexinas (resveratrol e  $\epsilon$ -viniferina). Sem induzir a morte celular, o tratamento de plantas de videira com esse polímero reduziu a infecção de *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola* em 55 e 75%, respectivamente (Aziz *et al.*, 2003).

Com base nesses estudos, uma empresa francesa comercializa um produto à base de laminarana (Iodus 40<sup>®</sup>) capaz de induzir resistência em trigo contra doenças como fusariose, oídio e septoriose (Goëmar, 2008). Com a aplicação desse produto, não se tem observado fitotoxidez e os custos energéticos para a planta, advindos da indução da resistência, são aparentemente pequenos ou mesmo inexistentes. Esse ingrediente natural (laminarana) é facilmente biodegradável e possui uma DL<sub>50</sub> superior a 5000 mg/kg de peso vivo. A laminarana e os oligômeros de laminarana são potentes elicitores de defesa em plantas dicotiledôneas (tomate e feijão) e monocotiledôneas (trigo e arroz), podendo ser uma ferramenta para o controle de doenças das culturas (Klarzynski, 2000; Aziz *et al.*, 2003).

A defesa de plantas pode ser elicitada também com a aplicação de outros polissacarídeos extraídos de algas marinhas. Por exemplo, Mercier *et al.* (2001) observaram, após a aplicação de carragenana em plantas de fumo, o incremento da atividade de vias metabólicas de etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico, como também da produção local de quitinase e inibidores de proteinases.

Em trabalho de bioprospecção, conduzido pelo Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), concluiu-se que extratos e polissacarídeos da alga verde *Ulva fasciata* apresentam potencial para controlar doenças de plantas, tais como o oídio (*Erysiphe polygoni*) e a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). O tratamento prévio das folhas com o extrato de *Ulva fasciata* reduziu em até 80% o número de colônias de oídio do feijoeiro (Leonetti *et al.*, 2003). A aplicação foliar do extrato da alga *Ulva fasciata* também reduziu a severidade da antracnose do feijoeiro em condições de casa-de-vegetação (Paulert, 2005; Abreu, 2005) e a campo (Loffaguem *et al.*, 2004). Em experimento de campo com a cultivar Uirapuru de feijoeiro, altamente suscetível à antracnose, observou-se que em parcelas que receberam pulverizações a cada 30 dias com o extrato de *Ulva fasciata* houve redução de 50% na severidade da doença em relação às plantas testemunhas. Este efeito protetor pode ser comparado ao tratamento com fungicidas (Loffaguem *et al.*, 2004).

Paulert *et al.* (2007) identificaram o polissacarídeo de *Ulva fasciata* por RNM-<sup>1</sup>H e RNM-<sup>13</sup>C como unidades repetidas de ácido ulvanobiurônico-3-sulfato, denominado previamente de ulvana. Nos experimentos em casa-de-vegetação, a aplicação foliar preventiva de ulvana (10 mg/ml) reduziu a severidade da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em 40%. Considerando que a ulvana não inibe o crescimento micelial e a germinação dos conídios do fungo *in vitro* (Paulert, 2005; Paulert *et al.*, 2007), sugere-se que o controle se deve à indução da resistência da planta. De fato, Cluzet *et al.* (2004) demonstraram que o tratamento de plantas de alfafa com esse polissacarídeo sulfatado elicitamente múltiplas respostas de defesa em face à infecção de *Colletotrichum trifolii*, causador da antracnose. Estas respostas incluem a biosíntese de fitoalexinas e de proteínas relacionadas à patogênese. A resposta de máxima eficiência ocorreu dois dias após a elicitação com 500 µg/ml, aplicado em pulverização foliar. Não se constatou fitotoxicidade do extrato nem alteração do metabolismo primário da planta.

## Macroalgas Marinhas com Ação Bioestimulante

Extratos de espécies de algas podem apresentar propriedades bioestimulantes quando aplicados às plantas, sendo capazes de estimular processos fisiológicos e, assim, aumentar a produtividade. Extratos de *Ascophyllum nodosum* estimulam a fotossíntese, a absorção e a utilização de nutrientes (Göemar, 2008) e possuem atividade antioxidante em plantas (Allen *et al.*, 2001; Durand, *et al.*, 2003). A pulverização de plantas com produtos à base de extratos dessa espécie pode aumentar a atividade de nitrato redutase, uma enzima-chave no metabolismo do nitrogênio, estimulando o crescimento de plantas em condições nutritivas adversas, principalmente em deficiência de nitrogênio (Durand *et al.*, 2003).

Extratos de algas são muitas vezes comercializados em mistura com outros nutrientes e compostos. Uma das principais vantagens nessas misturas consiste justamente em melhorar o desempenho dos nutrientes aplicados, aumentando sua absorção, dispersão e aproveitamento pela planta.

O produto comercial Roots® (Lisa Products Corp., New Haven) é composto de uma mistura de ácidos húmicos, extratos de algas marinhas, tiamina e ácido ascórbico que, quando aplicado em feijoeiro, aumenta o peso fresco das vagens (Russo & Berlyn, 1992). Extratos de algas são aplicados altamente diluídos, resultando em pequenas quantidades de material por área, uma vez que as moléculas bioativas desempenham seu papel em baixas concentrações. Microelementos são sugeridos como os ingredientes ativos destes extratos, mas Blunden *et al.* (1986) concluíram que a quantidade destes nutrientes aplicados representa uma proporção insignificante das necessidades totais das plantas. Assim, a presença de hormônios é sugerida como responsável por, no mínimo, alguns dos efeitos. Verifica-se que extratos de algas comerciais possuem alto nível de atividade hormonal (citocinina). Apesar disso, o conteúdo de citocinina no extrato é provavelmente muito baixo para exercer um efeito biológico quando adicionado ao solo (Russo & Berlyn, 1992).

Muitas algas possuem compostos denominados betaínas, que apresentam propriedades semelhantes a citocininas, aumentando a retenção da clorofila (Blunden *et al.*, 1986). As betaínas estão provavelmente envolvidas na maior resistência à geada e à seca observada em plantas tratadas com extratos de algas. Betaínas são detectadas na maioria das espécies de algas usadas na produção de extratos comerciais. Por exemplo, *Ascophyllum nodosum* produz betaína ácido  $\alpha$ -aminobutírico, betaína ácido  $\beta$ -aminovalérico e laminina, enquanto que espécies de *Laminaria* sintetizam uma grande gama de betaínas incluindo a betaína glicina (Blunden *et al.*, 1986; Wu *et al.*, 1997, 1998).

Os genótipos vegetais parecem responder diferentemente ao tratamento com bioestimulantes. Assim, Martinez-Lozano *et al.* (2000) observaram que o produto comercial Algaenzims™, aplicado no solo durante a semeadura, afetou diferentemente o desenvolvimento e crescimento de cinco cultivares de feijoeiro. Quando o tratamento foi realizado na semeadura e 15 dias após, via solo e via foliar, observou-se um aumento significativo no número de nós e maior alongamento dos internódios.

Produtos comerciais à base de *Ascophyllum nodosum* aumentam frequentemente a produtividade das plantas. Koo & Mayo (1994) constataram aumento de 10 a 25% em produtividade e diminuição de queda de frutos em plantas de citros com a aplicação aérea de extratos de algas. Em relação à qualidade de frutos, tem-se observado que a pulverização aérea com extrato de algas aumenta a coloração avermelhada de maçãs em cultivo orgânico (Marangoni *et al.*, 2004). Em cultivo convencional, Malaguti *et al.* (2002) encontraram o mesmo resultado na cultivar Mondial Gala, contudo, o inverso para a cultivar Fuji.

## Considerações Finais

A tendência atual do mercado consumidor é a crescente demanda por alimentos livres de produtos químicos nocivos à saúde do homem e prejudiciais à qualidade do ambiente. Portanto, a busca por produtos naturais que proporcionem o cultivo de vegetais com qualidade e livres de agroquímicos é uma necessidade

para o setor agrícola. As macroalgas marinhas e seus derivados são fontes de novas moléculas que apresentam potencial biotecnológico na obtenção de produtos naturais com ação bioestimulante e/ou fitoprotetora. Tais produtos podem proporcionar aumentos na produtividade das plantas, seja por meio do estímulo de sua fisiologia ou do controle de doenças. Aliado a isso, os produtos naturais que utilizam macroalgas como matéria prima podem apresentar os maiores retornos na relação custo/benefício dos investimentos em pesquisa, pois não necessitam da síntese de novas moléculas. Assim, a pesquisa deve atuar também no sentido de disponibilizar esses produtos no mercado para facilitar sua aquisição e uso pelos agricultores.

## Referências

- Abourriche, A.; Charrouf, M.; Berrada, M. & Francisco, C. Antimicrobial activities and cytotoxicity of the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Fitoterapia* 70: 611-614. 1999.
- Abreu, G.F. Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Dissertação de Mestrado. Florianópolis SC. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.
- Allen, V.G.; Pond, K.R.; Sake, K.E.; Fontenot, J.P.; Bagley, C.P.; Ivy, R.L.; Evans, R.R.; Schmidt, R.E.; Fike, J.H.; Zhang, X.; Ayad, J.Y.; Brown, C.P.; Miller, M.F.; Montgomery, J.L.; Mahan, J.; Wester, D.B. & Melton, C. Tasco: Influence of a brown seaweed on antioxidants in forages and livestock – a review. *Journal of Animal Science* 79: 21-31. 2001.
- Ara, J.; Ehteshamul-Haque, S.; Sultana, V.; Qasim, R & Ghaffar, A. Effect of *Sargassum* seaweed and microbial antagonists in the control of root rot disease of sunflower. *Pakistan Journal of Botany* 28: 219-223. 1996.
- Aziz, A.; Poinsot, B.; Daire, X.; Adrian, M.; Bézier, A.; Lambert, B.; Joubert, J.M. & Pugin, A. Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopora viticola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 1118-1128. 2003.
- Bennamara, A.; Abourriche, A.; Berrada, M.; Charrouf, M.; Chaib, N.; Boudouma, M. & Garneau, F.X. Methoxybifurcarenone: an antifungal and antibacterial meroditerpenoid from the brown alga *Cystoseira tamariscifolia*. *Phytochemistry* 52: 37-40. 1999.
- Blunden, G.; Cripps, A.L.; Gordon, S.M. & Turner, C.H. The characterization and quantitative estimation of betaines in commercial seaweed extracts. *Botanica Marina* 29: 155-160. 1986.
- Cluzet, S.; Torregrosa, C.; Jacquet, C.; Lafite, C.; Fournier, J.; Mercier, L.; Salamagne, S.; Briand, X.; Esquerré-Tugayé, M.T. & Dumas, B. Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. *Plant, Cell and Environment* 27: 917-928. 2004.
- Dixon, G.R. & Walsh, U.F. Suppressing *Pythium ultimum* induced damping-off in cabbage seedlings by biostimulation with proprietary liquid seaweed extracts. *Acta Horticulturae* 635: 103-106. 2004.
- Durand, N.; Briand, X. & Meyer, C. The effect of marine substances (N Pro) and exogenous cytokinins on nitrate reductase activity in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 119: 489-493. 2003.
- Gestinari, L.M.S.; Henriques, A.B. & Yoneshigue-Valentin, Y. Utilização da farinha seca de *Ulva* spp. e *Sargassum* spp. como bioestimulantes de crescimento na olericultura. *Leandra* 17: 45-70. 2002.
- Goëmar. Un nouvelle approche de protection. Disponível em: <[www.goëmar.com/base/util/bin74\\_2\\_1.htm](http://www.goëmar.com/base/util/bin74_2_1.htm)>. Acesso em: 03 jan. 2008.
- Horikawa, M.; Noro, T. & Kamei, Y. Characterization and purification of antibacterial substances from a red alga, *Laurencia okamuræ*. *Marine and Highland Bioscience Center Report* 3: 45-52. 1996.

- Jenkins, T.; Blunden, G.; Wu, Y.; Hankins, S.D. & Gabrielsen, B.O. Are the reductions in nematode attack on plants treated with seaweed extracts the result of stimulation of the formaldehyde cycle? *Acta Biologica Hungarica* 49: 421-427. 1998.
- Klarzynski, O.; Plesse, B.; Joubert, J.M.; Yvin, J.C.; Kopp, M.; Kloareg, B. & Fritig, B. Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiology* 124:1027-1037. 2000.
- König, G.M. & Wright, A.D. Sesquiterpene content of the antibacterial dichloromethane extract of the marine red alga *Laurencia obtusa*. *Planta Medica* 63: 186-187. 1997.
- Koo, R.C.J. & Mayo, S. Effects of seaweed sprays on citrus fruit production. *Proceedings of the Florida State Horticultural Science* 107: 82-85. 1994.
- Kuwada, K.; Ishii, T.; Matsushita, I.; Matsumoto, I. & Kadoya, K. Effects of seaweed extracts on hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and their infectivity on trifoliolate orange roots. *Journal of Japanese Society of Horticultural Science* 68: 321-326. 1999.
- Laporte, D.; Vera, J.; Chandia, N.P.; Zúniga, E.A.; Matsushiro, B. & Moenne, A. Structurally unrelated algal oligosaccharides differentially stimulate growth and defense against tobacco mosaic virus in tobacco plants. *Journal of Applied Phycology* 19: 79-88. 2007.
- Lapshina, L.A.; Reunov, A. V.; Nagoskaya, V.P.; Zvyagintseva, T.N. & Shevchenko, N.M. Inhibitory effect of fucoidan from brown alga *Fucus evanescens* on the spread of infection induced by tobacco mosaic virus in tobacco leaves of two cultivars. *Russian Journal of Plant Physiology* 53: 246-251. 2006.
- Leonetti, D.B.; Gonzaga, F.; Horta, P.A. & Stadnik, M.J. Eficiência de extratos de macroalgas marinhas no controle de bactérias fitopatogênicas e do oídio do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 28: 380. 2003. (Resumo).
- Lizzi, Y.; Coulomb, C.; Polian, C.; Coulomb, P.J. & Coulomb, P.O. L'algue face au Mildiou quel avenir? *Phytoma* 508: 29-30. 1998.
- Loffaguen, J.C.; Hartmann, O.E.L.; Talamini, V. & Stadnik, M.J. Extratos naturais no controle da antracnose e na produtividade do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 29: 107. 2004. (Resumo).
- Malaguti, D.; Rombola, A.D.; Gerin, M.; Simoni, G.; Tagliavini, M. & Marangoni, B. Effect of seaweed extracts-based leaf sprays on the mineral status, yield and fruit quality of apple. *Acta Horticulturae* 594: 357-359. 2002.
- Marangoni, B.; Rombola, A.D. & Sorrenti, G. Use of natural compounds for plant nutrition and protection in organic farmed orchards. *Bulletin OILB/SROP* 27: 129-136. 2004.
- Martinez-Lozano, S.J.; Verde-Star, J.; Torres-Cepeda, T.E.; Maiti, R.; Moreno-Limon, S. & Garcia, A.E.I. Effect of the commercial product Algaenzims<sup>TM</sup> on the growth and development of some varieties of *Phaseolus vulgaris* L. in the early stages. *Phyton-Internacional Journal of Experimental Botany* 68:65-75. 2000.
- Melo, V.M.M.; Medeiros, D.A.; Rios, F.J.B.; Castelar, L.I.M. & Carvalho, A.F.F.U. Antifungal properties of proteins (Agglutinins) from the red alga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux. *Botanica Marina* 40: 281-284. 1997.
- Ménard, R.; Alban, S.; Ruffray, P.; Jamois, F.; Franz, G.; Fritig, B.; Yvin, J-C. & Kauffmann, S. b-1,3 glucan sulfate, but not b-1,3 glucan, induces the salicylic acid signaling pathway in tobacco and arabidopsis. *The Plant Cell* 16: 3020-3032. 2004.
- Ménard, R.; Ruffray, P.; Fritig, B.; Yvin, J-C. & Kauffmann, S. Defense and resistance-inducing activities in tobacco of the sulfated b-1,3 glucan PS3 and its synergistic activities with the unsulfated molecule. *Plant Cell Physiology* 46: 1964-1972. 2005.
- Mercier, L.; Lafitte, C.; Borderies, G.; Briand, X.; Esquerré-Tugayé, M-T. & Fournier, J. The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist* 149: 43-51. 2001.
- Oliveira, E.C. A exploração de algas marinhas no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. *Phycologia Latino-Americana* 1: 5-17. 1981.
- Paracer, S.; Tarjan, A.C. & Hodgson, L.M. Effective use of marine algal products in the management of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 19: 194-200. 1987.
- Paulert, R. Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata*. Dissertação de Mestrado. Florianópolis SC. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de Santa Catarina. 2005.

- Paulert, R.; Smania Júnior, A.; Stadnik, M. & Pizzolatti, M. Antimicrobial properties of extracts from the green seaweed *Ulva fasciata* Delile against pathogenic bacteria and fungi. *Algological Studies* 123: 123-130. 2007.
- Rahman, A.U.; Choudhary, M.I.; Majeed, A.; Shabbir, M.; Ghani, U. & Shameel, M. A Succinylanthranilic acid ester and other bioactive constituents of *Jolyna laminarioides*. *Phytochemistry* 46: 1215-1218. 1997.
- Roullier. La gamme d'amendements calciques au lithothamne pour les sols acides. Disponível em: <<http://www.roullier.com/>>. Acesso em: dez. 2008.
- Russo, R.O. & Berlyn, G.P. Vitamin-humic-algal root biostimulant increases yield of green bean. *HortScience* 27: 847. 1992.
- Sultana, V.; Ehteshamul-Haque, S.; Ara, J. & Athar, M. Comparative efficacy of brown, green and red seaweeds in the control of root infecting fungi in okra. *International Journal Environmental Science & Technology* 2: 129-132. 2005.
- Vlachos, V.; Critchley, A.T. & Holy, A. Antimicrobial activity of extracts from selected southern African marine macroalgae. *South African Journal of Science* 93: 328-332. 1997.
- Wilkie, A.C. & Mulbry, W.W. Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. *Bioresource Technology* 84: 81-91. 2002.
- Wosnitza, T.M.A. & Barrantes, J.G. Utilization of seaweed *Ulva* sp. in Paracas Bay (Peru): experimenting with compost. *Journal of Applied Phycology* 18: 27-31. 2005.
- Wu, Y.; Jenkins, T.; Blunden, G.; Whapham, C. & Hankins, S.D. The role of betains in alkaline extracts of *Ascophyllum nodosum* in reduction of *Meloidogyne javanica* and *M. incognita* infestations of tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology* 20: 99-102. 1997.
- Wu, Y.; Jenkins, T.; Blunden, G.; Von Mende, N. & Hankins, S.D. Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. *Journal of Applied Phycology* 10: 91-94. 1998.



## Capítulo 9

# Óleos Essenciais no Controle Fitossanitário

Lilia Aparecida Salgado de Moraes

*Embrapa Meio Ambiente. CP 69; 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: lilia@cnpma.embrapa.br*

### Introdução

Os produtos naturais foram utilizados até a metade do século XIX para o controle de pragas e doenças agrícolas. Dentre estes, os à base de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, *Chrysanthemum roseum*, *Chrysanthemum coccineum* (fontes de piretro), *Derris* spp. e *Lonchocarpus* spp. (fontes de rotenona) e *Nicotiana* (fonte de nicotina) eram utilizados, principalmente, como inseticidas e fungicidas. No início do século XX, produtos com maior toxidez começaram a ser utilizados. Além das plantas, também foram utilizados preparados à base de enxofre, sabão, óleo de baleia, boro e arsênico (Boyce, 1974). Nesta época já havia estímulo para a substituição de alguns produtos por outros de menor toxicidade ao homem, principalmente os arsenicais, porém, não havia ainda a preocupação sobre o uso contínuo destes produtos no ambiente. Notava-se um incentivo ao uso de preparados à base de plantas (Decker, 1942). Durante a Segunda Guerra Mundial, grandes áreas de cultivo de plantas usadas como defensivos naturais foram dizimadas ou tiveram seu fornecimento suspenso, o que ocasionou uma busca por outros produtos que pudessem substituir os naturais. Assim, teve início a fase dos produtos sintéticos para o controle fitossanitário, o que aparentava ser a solução para a agricultura mundial, substituindo completamente os defensivos naturais. O seu uso contribuiu para que ocorressem grandes mudanças, como o aumento das áreas de cultivo, redução do número de trabalhadores nas lavouras e aumento na produtividade. Práticas agrícolas até então utilizadas, como a rotação e o consórcio de culturas, passaram a ser pouco ou não mais utilizadas, principalmente em áreas de cultivo extensivo (Saito & Lucchini, 1998).

Nos anos subsequentes, alguns problemas começaram a surgir. Os produtores notaram que a utilização dos agrotóxicos não podia garantir o controle de pragas e fitopatógenos por um longo tempo. Esses agrotóxicos causavam a eliminação de inimigos naturais, insetos e microrganismos benéficos ao ambiente e ao homem; contribuía na seleção de organismos-alvo resistentes, o que significava a necessidade de utilização de maiores quantidades de produtos gerando mais danos ecológicos e poluição ambiental. Quando os produtos perdiam a eficiência, fazia-se a substituição por novos agrotóxicos, o que, conseqüentemente, dava início a um novo ciclo de desequilíbrios (Mariconi, 1981).

Na década de 1970, os agrotóxicos sintéticos passaram a ser mais seletivos, com menor espectro de ação, bem como menor persistência no ambiente. Iniciava-se o processo de conscientização de que era melhor reduzir a população de pragas e patógenos-alvo no período de maior incidência, do que a tentativa de total erradicação e conseqüente contaminação do ambiente e dos alimentos (Saito & Lucchini, 1998; Vieira & Fernandes, 1999). Assim, surgiu a necessidade de resgatar a utilização de substâncias naturais, biologicamente ativas, contra as pragas e patógenos, bem como a utilização de controle biológico. Outro fator importante que contribuiu para o interesse pelas substâncias naturais foi o avanço do sistema orgânico de produção. Com isso, houve necessidade de se buscar práticas agrícolas de baixo impacto ambiental, que substituíssem os métodos convencionais de controle de pragas e doenças.

Algumas plantas produzem compostos secundários, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de novos defensivos naturais ou serem precursores de semi-síntese química, no desenvolvimento de produtos. Neste capítulo, será abordada a aplicabilidade dos óleos essenciais no controle fitossanitário.

## **Substâncias Provenientes do Metabolismo Secundário**

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente nas células, direcionadas pela ação de enzimas. Estas reações visam, inicialmente, sintetizar compostos como açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e alguns polímeros, dentre outros, que vão garantir a sobrevivência dos organismos. Por ser a síntese destes compostos comuns aos seres vivos e diretamente relacionadas à manutenção da vida, são considerados integrantes do metabolismo primário. O metabolismo secundário difere do primário pelo fato de a produção das substâncias estar restrita na natureza e limitada a um menor número de espécies. Os metabólitos secundários, como são chamados os produtos derivados do metabolismo secundário, não estão diretamente ligados à manutenção da vida do vegetal, porém, conferem vantagens à sua sobrevivência (Santos, 1999), permitindo melhor adaptação às condições impostas pelo ambiente (Gros *et al.*, 1985). Sabe-se que o metabolismo primário influencia diretamente no secundário, porém, a interface entre ambos ainda não é muito clara.

Os compostos secundários sintetizados pelas plantas são provenientes de três precursores principais: ácido chiquímico ou chiquimato, que origina compostos aromáticos, ligninas e cumarinas; aminoácidos, de onde derivam alguns alcalóides e o acetato. Este último pode ser redirecionado em outras três vias: condensação, ácido cítrico e mevalonato. Por meio da condensação são originados os ácidos graxos e as acetogeninas. Pela via do ácido cítrico são sintetizados outros tipos de alcalóides. A via do mevalonato é responsável pela síntese dos isoprenóides, que dão origem aos terpenos, componentes dos óleos essenciais. Há também compostos derivados da ligação entre o ácido chiquímico e o acetato, gerando uma rota sintética mista. Estes são os flavonóides, alguns taninos e as antraquinonas (Mann, 1987; Di Stasi, 1996).

A síntese dos metabólitos secundários é regida pelas informações genéticas que compõem o vegetal, porém, esta pode ser redirecionada devido à ação de fatores bióticos (microrganismos, insetos ou plantas) e abióticos (luz, temperatura e estresse hídrico, entre outros), que podem gerar situações de estresse ao vegetal. Estas alterações na rota sintética e sua possível interferência nos resultados dos ensaios de atividade sobre fitopatógenos também serão abordados neste capítulo.

## **Funções dos Metabólitos Secundários nos Vegetais**

Inicialmente, os metabólitos secundários foram considerados produtos finais do metabolismo primário ou mesmo resíduos, que seriam excretados, sem apresentar utilidade para o vegetal. No início do século XX, o uso destes compostos para fins medicinais e industriais já era amplamente conhecido, porém, apenas na década de 1960, pesquisadores começaram a observar que estes apresentavam funções ecológicas importantes para os vegetais.

Os vegetais se defendem pelo quimismo, pois as plantas não têm como se deslocar de um ambiente para outro com condições ambientes mais favoráveis à sua sobrevivência. Nem todas as funções dos metabólitos secundários na planta que o produz são conhecidas. Entretanto, são conhecidas as funções que garantem a sobrevivência dos vegetais na natureza como: proteção contra herbivoria (deterência, repelência e toxidez), atração de polinizadores ou dispersores de sementes, proteção aos raios ultravioleta, alelopatia e a atração de inimigos naturais.

As fitoalexinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, sintetizados pelos vegetais em resposta a estresses físicos, químicos ou biológicos. É um mecanismo de resistência a microrganismos patogênicos, pois se acumulam ao redor do tecido após infecção ou injúria, e possuem atividade antimicrobiana, sendo uma estratégia de sobrevivência de alguns vegetais. A indução de produção de fitoalexinas indica a presença de composto(s) com características eliciadoras e foram identificadas em mais de 20 famílias botânicas de vegetais superiores, caracterizando-se mais de 300 fitoalexinas, de diferentes classes de compostos químicos (cumarinas, flavonóides, sesquiterpenos). Tem-se como exemplo os sesquiterpenos risitina e capsidiol produzidos por algumas espécies de solanáceas (Taiz & Zeiger, 2004).

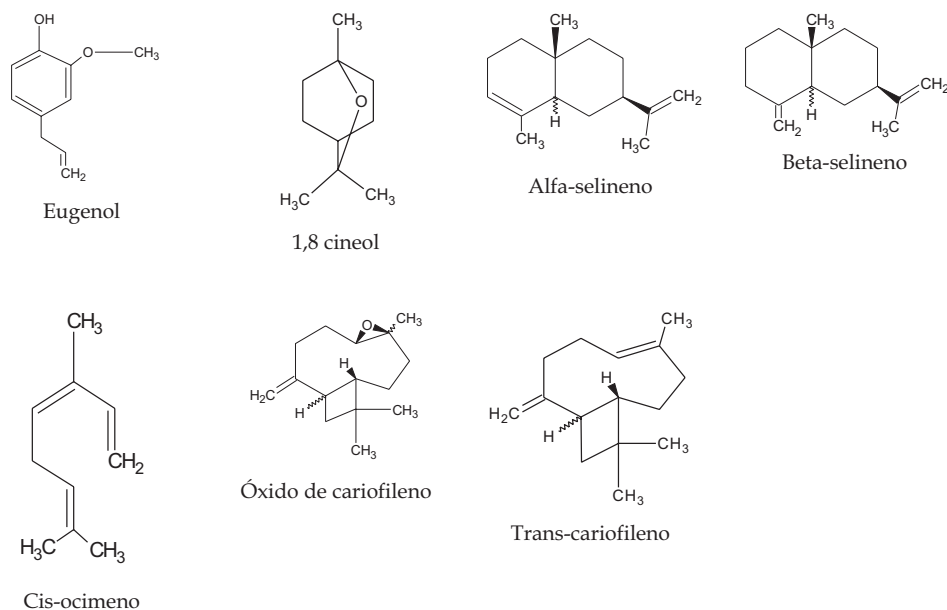
Geralmente, as fitoalexinas não estão presentes nas plantas antes da infecção, porém, são sintetizadas após o ataque do patógeno, em função da ativação de novas rotas metabólicas. O ponto de controle é o início do processo de transcrição do gene. Isto demonstra que as plantas não armazenam as enzimas responsáveis pela síntese de fitoalexinas. Porém, logo após o contato do tecido com o patógeno, dá-se início à transcrição dos RNAs mensageiros específicos e a sua tradução em enzimas correspondentes (Taiz & Zeiger, 2004). As fitoalexinas agem sobre o fungo por meio da granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares e inativação de enzimas, o que inibe a germinação, a alongação do tubo germinativo e o crescimento micelial (Lo *et al.*, 1996).

Em regiões nas quais não se observa interferência humana, as interações das plantas com outras espécies vegetais, microrganismos, insetos e animais encontram-se em equilíbrio, estando cada espécie em contínua adaptação às condições ambientes para garantia da sua sobrevivência. A capacidade de sintetizar esse arsenal de substâncias químicas contribui para que isto ocorra. Ressalta-se que estas substâncias apresentam uma seletividade natural e baixa toxicidade, pois atacam os agressores, preservando os organismos úteis. Se as plantas, principalmente as não domesticadas, conseguem se manter na natureza, defendendo-se de seus mais diversos predadores, patógenos ou outras espécies vegetais, utilizando-se dos metabólitos secundários, o uso destes compostos no controle fitossanitário pode ser relevante na agricultura.

## Óleos Essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, geralmente odoríferas e líquidas, constituídos, na maioria das vezes, por moléculas de natureza terpênica. Frequentemente apresentam odor agradável e marcante. Podem ser extraídos por meio de arraste com vapor d'água, hidrodestilação ou expressão de pericarpo de frutos cítricos. Porém, há outros métodos de extração como a “*enfleurage*” ou enfloração, extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (utilizado na indústria) e por solventes orgânicos apolares (não apresentam valor comercial). Em temperatura ambiente apresentam aspecto oleoso, tendo como principal característica a volatilidade. Isto os diferencia dos óleos fixos, que são misturas de substâncias lipídicas, geralmente provenientes de sementes (óleo de rícino, manteiga de cacau e óleo de linhaça). Apresentam-se geralmente incolores ou levemente amarelados, com sabor ácido e picante, pouco estáveis em presença de luz, calor e ar, além de serem pouco solúveis em água (Simões & Spitzer, 1999; Saito & Scramin, 2000). Além de terpenos, provenientes da rota do ácido mevalônico ou mevalonato, há alguns óleos essenciais derivados do fenilpropanóides. Os terpenos são constituídos de duas ou mais unidades isoprênicas. Cada molécula de isopreno é formada por cinco átomos de carbono (C5). De acordo com o tamanho da molécula, os terpenóides recebem denominação diferente: compostos formados por duas unidades isoprênicas (C10) são classificados como monoterpenos (mentol, limoneno, linalol, citral); os compostos formados por três unidades isoprênicas (C15) são classificados como sesquiterpenos ( $\alpha$ -selineno e  $\beta$ -cariofileno); compostos

formados por quatro unidades isoprênicas (C<sub>20</sub>) são os diterpenos e os compostos formados por seis unidades isoprênicas (C<sub>30</sub>) são classificados como triterpenos. Os monoterpenos e os sesquiterpenos são os compostos de ocorrência mais frequente na natureza, sendo os primeiros mais facilmente encontrados. São também responsáveis por grande parte das atividades biológicas dos óleos essenciais. As estruturas de alguns constituintes dos óleos essenciais encontram-se na Figura 1.



**Figura 1.** Estruturas de compostos de óleos essenciais.

## Óleos Essenciais na Agricultura

A atividade fungitóxica de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas por meio de hidrodestilação, como os de *Cymbopogon citratus* (folha), *Ageratum conyzoides* (folha), *Alpinia carinata* (folha), *Boswellia serrata* (talo), *Citrus aurantifolia* (folha), *Citrus reticulata* (casca), *Citrus sinensis* (casca), *Curcuma longa* (rizoma), *Eupatorium cannabinum* (folha), *Hyptis suaveolens* (folha), *Juniperus communis* (folha), *Mentha viridis* (folha), *Pinus* spp. (folha) e *Vetiveria zizanioides* (raiz) sobre *Aspergillus flavus* foi avaliada por Mishra & Dubey (1994). O óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) teve atividade positiva sobre o fungo, com a concentração máxima de inibição (MIC) de 3000 ppm. Em testes realizados pelos mesmos autores, para verificação de fitotoxicidade do citral, monoterpene presente em maior concentração no óleo essencial de capim limão, não foi observada interferência sobre a germinação de sementes e o crescimento das plântulas de arroz.

A maior atividade antifúngica do citral foi encontrada em experimento realizado na Índia, quando este é proveniente de óleo essencial extraído de plantas colhidas entre maio e novembro, seguido dos meses de janeiro e dezembro, com eficácia intermediária. A extração de óleo essencial de capim limão colhido em fevereiro, março e abril não tem sido indicada, pois, mesmo em concentrações altas (hipertóxicas), não apresentou atividade positiva. Em teste realizado para avaliar a atividade fungitóxica do citral sobre *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Botrytis*, nas concentrações de 500 ppm (hipotóxica), de 1000 ppm (tóxica) e de 1500 ppm (hipertóxica), houve total inibição de crescimento fúngico somente com a concentração hipertóxica (Mishra & Dubey, 1994).

De acordo com Bankole & Joda (2004), o óleo essencial do capim limão reduziu a deterioração de sementes de melão, previamente inoculadas com *Penicillium citrinum*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus tamarii*, reduzindo, parcialmente, a produção de aflatoxina em sementes descascadas e inoculadas com *Aspergillus flavus*, nas concentrações de 0,1 e 0,25% (v/m), e completamente nas concentrações de 0,5 e 1% (v/m).

Em experimentos realizados por Adegoke & Odesola (1996), sementes de feijão e de milho tratadas com óleo essencial de capim limão e armazenadas por dez dias, não apresentaram deterioração física, alteração no odor e na coloração, e não houve crescimento de *Aspergillus flavus*. Esses autores verificaram que o potencial fungicida do citral permaneceu inalterado por até 210 dias do início do armazenamento das sementes tratadas, quando ocorreu um declínio da sua atividade. A atividade se manteve inalterado mesmo quando o óleo essencial foi submetido a temperaturas entre 5 °C e 100 °C, o que demonstra sua natureza termo-estável, indicando a possibilidade deste óleo ser utilizado como inibidor de fungos de armazenamento.

Belém *et al.* (1996) avaliaram a atividade antifúngica de óleos essenciais de *Schinus molle* (aroeira), *Cymbopogon citratus* (capim limão), *Anacardium occidentale* (cajuero) e *Peumus boldus* (boldo) sobre o crescimento micelial de *Aspergillus* e *Penicillium*, isolados de sementes de *Vigna unguiculata*, *Zea mays* e *Arachis hypogaeae* e verificaram que somente o óleo essencial do capim limão inibiu o crescimento dos fungos.

A atividade antifúngica de óleos essenciais extraídos de 22 plantas, pela técnica da hidrodestilação, sobre *Rhizoctonia solani* foi testada por Kishore *et al.* (1983). Os autores observaram que o óleo essencial de *Lippia alba* (cidreira brasileira ou falsa cidreira) inibiu o crescimento micelial do fungo. Esse óleo também inibiu o crescimento de *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum dematium*, *Curvularia lunata*, *Penicillium italicum* e *Rhizopus arrhizus*. Dando continuidade ao trabalho, Kishore *et al.* (1989) avaliaram a ação do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* no tratamento de sementes de *Phaseolus aureus*, para o controle do tombamento de mudas causado por *Rhizoctonia solani*. O óleo essencial não interferiu na germinação das sementes e no crescimento das plântulas de feijão.

Zanandrea *et al.* (2004) verificaram que o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) inibiu o crescimento micelial de *Alternaria* sp., *Bipolaris oryzae*, *Curvularia* sp., *Gerlachia oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* isolados de arroz. Esses fungos foram sensíveis ao carvacrol, composto majoritário do óleo essencial

do orégano, destacando-se a redução do crescimento micelial de *Bipolaris oryzae*, mesmo na concentração mais baixa do óleo (1:32).

Salgado *et al.* (2003) avaliaram a atividade fungitóxica do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus urophylla* nas concentrações de 5, 50 e 500 mg/kg, sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. Os autores observaram redução no crescimento micelial dos fungos pelos três óleos. Segundo os autores, houve mudança na coloração do micélio de *Fusarium oxysporum*, sugerindo que pode ter havido oxidação, devido à presença de carbonilas, grupos alcoólicos e duplas ligações nas substâncias que compõem os óleos essenciais. A maior ação fungitóxica foi do óleo essencial de *Eucalyptus urophylla*. Esta atividade foi atribuída ao sesquiterpeno globulol, composto majoritário deste óleo essencial, não detectado nos demais. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Aleu *et al.* (2001) que verificaram inibição total do crescimento de *Botrytis cinerea*, nas concentrações 100 e 200 mg/kg do globulol.

O óleo essencial de *Salvia officinalis* e de alguns de seus componentes (1,8 cineol, cânfora  $\alpha$  e  $\beta$ -tujona) foram comparados com benomyl e iprodione quanto à atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea* e verificou-se atividade para o óleo essencial e cânfora superiores aos padrões comerciais (Carta *et al.*, 1996).

Silva & Bastos (2007) avaliaram a atividade fungitóxica do óleo essencial de dez espécies de *Piper*, coletadas na Amazônia, nas concentrações 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 e 1  $\mu$ l/ml, sobre o crescimento micelial e a germinação de basidiósporos de *Moniliophthora perniciosa* (sin. *Crinipellis perniciosa*), agente causador da vassoura-de-bruxa e sobre o crescimento micelial de *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*, causadores de podridão parda em frutos de cacaueteiro. A partir da concentração de 0,75  $\mu$ l/ml do óleo de *Piper callosum* e na concentração de 1  $\mu$ l/ml do óleo de *Piper marginatum* var. *anisatum* a inibição do crescimento micelial foi de 100%. O óleo essencial de *Piper dilatatum* foi o mais eficiente em inibir a germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa*, seguido pelos de *Piper callosum* e *Piper marginatum* var. *anisatum*. O óleo essencial de *Piper callosum* tem como composto majoritário o safrol (64%), além do  $\alpha$ -pineno (6,9%) e metil-eugenol em menor concentração (2,7%). O óleo de *Piper aduncum* é rico em dilapiol, com ação antifúngica comprovada sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. A atividade antifúngica destes óleos pode estar associada à presença de um desses ou da ação sinérgica dos compostos.

A atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e de *Monarda citriodora*, sobre *Alternaria brassicola*, *Alternaria solani*, *Alternaria flavus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Mycocentrospora acerina*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus sexualis*, *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Serpula lacrymans* e *Pythium ultimum* foi avaliada por Bishop & Thornton (1997). Os dois óleos proporcionaram alto nível de inibição de crescimento micelial, sendo que o de *Melaleuca* foi mais ativo. O constituinte majoritário do óleo essencial de melaleuca é o terpinen-4-ol (37,4%), seguido de  $\gamma$ -terpineno (19,4%) e  $\alpha$ -terpineno (9%). O óleo essencial de *Monarda citriodora* apresentou como marcador o timol (56,9%), seguido de  $\rho$ -cimeno (13%) e  $\gamma$ -terpineno (10%). Na continuidade dos estudos, Bishop e Reagan (1998) verificaram que o óleo essencial de melaleuca, nas concentrações de 1,6 e 3,2%, reduziu o crescimento de *Botrytis cinerea* em folhas de repolho. Na maior concentração a inibição foi semelhante ao dos fungicidas benomyl, carbendazin, metalaxyl e iprodione.

Medice *et al.* (2007) avaliaram o potencial de óleos essenciais de *Corymbia citriodora* (eucalipto citriodora) a 1%, *Cymbopogon nardus* (citronela) a 0,5% e *Thymus vulgaris* (tomilho) a 0,3% na inibição da germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* e na redução da severidade dos sintomas da ferrugem asiática, em casa-de-vegetação. Os autores constataram que os óleos inibiram em 100% a germinação dos urediniósporos. Todos os óleos retardaram a evolução da doença quando comparados com a testemunha, observando-se redução na severidade em média de 34,6 a 60,7% na cultivar MG/BR46 (Conquista) e de 45,7 a 62,3% na cultivar Suprema. As observações em microscopia eletrônica de varredura mostraram que houve murcha dos urediniósporos, quando tratados com o óleo essencial de tomilho. Para os demais tratamentos, foi observada redução no tamanho das urédias. Os resultados indicam que esses óleos essenciais têm potencial para o controle da doença.

A eficiência do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* na inibição do crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* e *Colletotrichum sublineolum* foi verificada por Bonaldo *et al.* (2007). O óleo inibiu também a germinação e a formação de apressórios em *Colletotrichum sublineolum*, porém, não foi observada a indução de síntese de fitoalexinas em mesocótilos de soja e sorgo. Também Fiori *et al.* (2000) observaram inibição no crescimento micelial de *Didymella bryoniae* pelos óleos de *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Ageratum conizoides*.

O potencial do óleo essencial de pimenta-de-macaco (*Piper aduncum*) no tratamento de sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata*), pela técnica da imersão, foi estudado por Lobato *et al.* (2007), que verificaram redução da incidência de *Aspergillus flavus*, *Penicillium* spp., *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium* spp. Não houve interferência na germinação das sementes, mesmo na maior concentração (1%).

Gadelha *et al.* (2003) estudaram a ação de dois produtos obtidos da mistura de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Mentha arvensis*, *Ocimum gratissimum*, *Eucalyptus terenticornis* e óleo fixo de soja, os quais foram aplicados para o tratamento pós-colheita do pedúnculo do melão "Orange flesh". O primeiro produto foi obtido da mistura de óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Mentha arvensis* e *Ocimum gratissimum* e o óleo fixo da soja. O segundo produto foi composto pelos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Mentha arvensis*, *Eucalyptus terenticornis* e o óleo fixo da soja. Os produtos foram emulsionados e aplicados aos frutos nas concentrações de 0; 10; 20; 30 e 40 ml/l de suspensão. A inoculação de *Fusarium* sp. foi efetuada 16 h antes ou após a aplicação dos produtos, para que se avaliasse a ação curativa ou preventiva dos mesmos. O primeiro produto foi mais eficiente em menor concentração que o segundo, para o tratamento preventivo. O segundo produto reduziu a incidência do fungo proporcionalmente ao aumento da concentração, o que indica ser mais eficiente para tratamento curativo em concentração igual ou superior a 40 ml/l. Os autores recomendam o tratamento pós-colheita de pedúnculos de melão com o primeiro produto preventivamente na concentração 20 ml/l e curativamente, na concentração 40 ml/l. A atividade do primeiro produto pode ser devido à presença do óleo essencial da *Mentha arvensis* na formulação, que tem em sua composição alta concentração de mentol (aproximadamente 70%) e ausência de cineol, composto majoritário do óleo essencial do eucalipto, presente apenas no segundo produto.



Faria *et al.* (2006) identificaram atividade positiva do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, sendo o eugenol o composto ativo, sobre *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Alternaria* spp. (isolados de cenoura e tomate), *Rhizoctonia* sp. e *Botryosphaeria rhodina*, por meio do método de difusão em ágar.

Avaliando o efeito do óleo essencial de *Lippia rugosa*, na concentração de 1000 mg/l, Tatsadjieu *et al.* (2009) verificaram inibição total do crescimento micelial de *Aspergillus flavus*. Os autores também verificaram a redução total na síntese de aflatoxina B<sub>1</sub>, na concentração 1000 mg/l, a partir do segundo dia de avaliação. A sua composição química foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massas, sendo o geraniol, neral e geranial os componentes majoritários, nas concentrações de 51,5%, 18,6% e 10,4%, respectivamente. O mecanismo de ação do óleo essencial de *Lippia rugosa* consiste na inibição da atividade da enzima H<sup>+</sup>-ATPase, responsável pela manutenção da homeostase celular e estabilidade osmótica, por meio da regulação da concentração iônica no interior da célula.

A utilização de óleos essenciais de espécies aromáticas e medicinais, isolados ou em combinação com outros métodos, poderá ter um importante papel no controle de fitopatógenos, contribuindo para a redução do uso de fungicidas e, conseqüentemente, um menor impacto ao ambiente (Mota & Pessoa, 2003). Esses produtos podem ter ação fungitóxica direta, pela inibição da germinação de esporos e do crescimento micelial, ou indireta, pela indução de produção de fitoalexinas ou outros compostos de defesa da planta. Entretanto, não se deve deixar de considerar que estes princípios ativos, mesmo sendo naturais, não deixam de ser substâncias químicas e devem ser usados com critério.

## **Influência dos Fatores Abióticos na Composição Química dos Óleos Essenciais**

A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os estímulos decorrentes do ambiente no qual a planta se encontra podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a síntese de diferentes compostos. Dentre estes fatores, destacam-se as interações planta-microrganismos, planta-insetos e planta-planta; idade e estágio de desenvolvimento, luminosidade, temperatura, água, nutrição, época e horário de coleta. Temperatura e luminosidade apresentam papel relevante na fotossíntese, pois a interação destes fatores garante um ambiente ideal para o processo fisiológico (Souza *et al.*, 2008).

O teor de óleos essenciais, na maioria das vezes, aumenta quando as plantas encontram-se em ambientes com temperatura elevada, porém, em dias muito quentes, pode-se observar perda excessiva destes óleos pela transpiração ou outras rotas metabólicas.

Avaliando os efeitos da evolução sazonal na composição do óleo essencial de *Virola surinamensis*, Lopes *et al.* (1997) concluíram que não houve variação no rendimento do óleo essencial nas diferentes estações do ano e horários de coleta, porém, a proporção relativa dos seus componentes alterou significativamente. Por outro lado, Chaves (2002) avaliou o efeito da época de corte (outono, inverno, primavera e verão) na composição do óleo essencial de folhas e inflorescências de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) e verificou que houve variação na composição do óleo em função da época. Nas folhas o componente majoritário foi o eugenol no verão, e o  $\beta$ -selineno e o trans-cariofileno no inverno. Nas inflorescências os níveis de eugenol foram baixíssimos e o 1,8-cineol foi o principal composto, sendo que no outono o seu teor foi reduzido.

Em ensaios realizados com *Melissa officinalis* em dois horários de coleta, Blank *et al.* (2005) concluíram que houve inversão no percentual de compostos majoritários do óleo essencial, obtendo-se 49,0% de neral e 34,4% de geranial às 9 h, e 34,1% e 50,8% às 15 h para neral e geranial, respectivamente. Esta alteração na composição pode ocasionar respostas diferenciadas em ensaios com fitopatógenos, pois, o composto responsável pela atividade biológica pode ter sua concentração alterada.

Bezerra *et al.* (2008) observaram alterações nos teores de acetato de trans-pinocarveila, acetato de mirtenila e  $\beta$ -pineno, componentes majoritários do óleo essencial de macela, quando extraídos de capítulos florais provenientes de diferentes épocas de colheita. Moraes *et al.* (2002) verificaram como compostos majoritários do óleo essencial extraído de folhas de *Ocimum selloi* o metilchavicol (24,1% e 29,9%), cis-anetol, (3,9% e 2,9%) e trans-anetol, com proporção relativa de 45,4% e 58,6% respectivamente, em amostras de plantas cultivadas em Botucatu-SP, e colhidas em junho de 2000 e janeiro de 2001.

Outro fator relevante na alteração do rendimento e composição química dos óleos essenciais é a precipitação. Chuvas intensas e constantes podem resultar na perda de substâncias hidrossolúveis presentes, principalmente, nas folhas e flores. Recomenda-se aguardar aproximadamente três dias após o cessar das chuvas para realizar a coleta, para que os teores de óleo essencial possam voltar ao normal. Por outro lado, estudos realizados com o intuito de avaliar a influência do estresse hídrico sobre a composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* demonstraram que, sob condições de estresse, houve redução do rendimento de massa seca total, ocorrendo, porém, um rendimento de óleo duas vezes maior. Os seus componentes tiveram alterações significativas, havendo redução no percentual de sesquiterpenos e aumento no percentual de linalol e metilchavicol (Simon *et al.*, 1992). Em ensaios em casa-de-vegetação com diferentes acessos de *Polygonum punctatum*, Lopes *et al.* (2001) avaliaram a influência de regimes hídricos (ambiente úmido, moderadamente úmido e seco) na produção de óleo essencial. Os autores observaram maior rendimento no ambiente seco. Este resultado demonstra que o aumento na síntese do óleo essencial pode funcionar como resposta adaptativa ao estresse hídrico, relacionando-se alguma resposta fisiológica às variações ambientais.

A ocorrência de variações na composição do óleo essencial de *Ocimum basilicum* (manjerição) e *Mentha piperita* (menta) em função de níveis de NPK utilizados no cultivo foi verificada por Hornok (1983). O aumento dos níveis

de nitrogênio reduziu o percentual de mentol e linalol. Houve incremento nos teores de mentol (em menta), linalol e estragol (no manjeriço), à medida que os níveis de potássio foram elevados. De acordo com Paulus *et al.* (2008), plantas de menta japonesa (*Mentha arvensis*) em cultivo hidropônico, submetidas a diversas concentrações da solução nutritiva, produziram diferentes teores de mentol e mentona, compostos majoritários do óleo essencial. Isto demonstra que estes compostos são diretamente influenciados pela nutrição das plantas.

A alteração dos compostos majoritários nos óleos essenciais, seja por fatores bióticos ou abióticos, pode influenciar diretamente nos resultados de testes sobre fitopatógenos. Observa-se divergência entre resultados provenientes de ensaios realizados com as mesmas espécies vegetais e patógenos. Vale ressaltar que os produtos químicos aos quais foram submetidos os diferentes isolados testados, também podem gerar diferenças nas respostas. Para minimizar esses efeitos e evitar que dados não conclusivos sejam publicados, o ideal é que, juntamente com os ensaios para verificação da atividade biológica, seja realizada a análise química dos óleos essenciais avaliados, para obter a sua caracterização fitoquímica. Assim, pode-se conhecer qual o composto majoritário do óleo essencial, bem como a composição química como um todo, responsável por conferir a sua ação sobre determinado fitopatógeno. Estes resultados mais concretos evitam que plantas com potencial de uso no controle de doenças de culturas relevantes possam ser descartadas ou que plantas com pouco ou nenhum potencial, virem alvo de estudos desnecessariamente.

A associação dos ensaios biológicos com a caracterização fitoquímica de óleos essenciais pode ser útil para as indústrias no desenvolvimento de futuros produtos biocompatíveis, seja como produto/componente *in natura* ou como modelo para síntese ou semi-síntese química de produtos com as características necessárias, ou seja, baixo custo, facilidade de aplicação, pequeno espectro de ação, baixa persistência residual, pouca ou nenhuma toxicidade ao homem, aos animais e ao ambiente.

## Considerações Finais

O controle de doenças de plantas, baseados na utilização de óleos essenciais e/ou na atividade biológica definida, com baixa ou nenhuma toxidez, teria grande utilidade prática. Estas substâncias naturais provenientes de plantas medicinais, aromáticas e condimentares, muitas vezes de fácil obtenção a baixo custo e que não tenham toxidez residual, podem ser uma alternativa para o controle de doenças de plantas, pois, na maioria são sistêmicos, de fácil degradação e pouco ou não fitotóxicos. Um aspecto relevante é que os óleos essenciais são produzidos por um organismo vivo, sujeito a várias alterações. Deve se observar, sempre que possível, o histórico da planta (como o local, horário e época de coleta, temperatura, pluviosidade e estágio de desenvolvimento, dentre outros), variedade ou quimiotipo da espécie em estudo e verificar sua composição química, antes de afirmar se determinada planta apresenta ou não atividade biológica sobre algum patógeno.

O composto majoritário (marcador) do óleo essencial deve ser sempre identificado, para que se conheça com qual composição obteve-se determinado resultado, para não inviabilizar a reprodutibilidade. É preciso ter cautela nas afirmações e usar sempre o princípio da repetição, para que se confirme o resultado antes de publicá-lo. Existem vários métodos de pesquisa descritos na literatura, porém, há a necessidade de padronização, para que a comparação entre os resultados seja possível.

A pesquisa na área de plantas medicinais como defensivos naturais é promissora, com possibilidade de novas e relevantes descobertas, porém, deve ser alicerçada em estudos interdisciplinares, para que se obtenham resultados conclusivos. Há ainda a necessidade de implantação de ensaios nas condições ecológicas de uso do produto, que ainda são em número reduzido quando comparado com a quantidade de ensaios *in vitro* publicados.

Os vegetais são uma fonte inesgotável de moléculas, muitas desconhecidas, que podem servir de modelo para síntese química, gerando produtos de baixo custo, eficazes, ambientalmente seguros, padronizados, registrados, com controle de qualidade visando a reprodutibilidade e constância de componentes químicos, e, principalmente, que atendam às necessidades dos produtores.

## Referências

- Adegoke, G. O. & Odesola, B. A. Storage of maize and cowpea and inhibition of microbial agents of biodeterioration using the powder and essential oil of lemon grass (*Cymbopogon citratus*). *International Biodeterioration & Biodegradation* 37: 81-84. 1996
- Aleu, J.; Hanson, J.R.; Gálan, R.H. & Collado, I.G. Biotransformation of the fungistatic sesquiterpenoids patchoulol, ginsenos, cedrol and globulol by *Botrytis cinerea*. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic* 11: 329-334. 2001.
- Bankole, S.A. & Joda, A.O. Effect of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) powder and essential oil on mould deterioration and aflatoxin contamination of melon seeds (*Colocynthis citrullus* L.). *African Journal of Biotechnology* 3: 52-59. 2004.
- Belém, L. F.; Araújo, E. & Lima, E.O. Estudo da Atividade *in vitro* de Produtos Vegetais contra Fungos de Armazenamento Isolados de Sementes de *Vigna unguiculata*, *Zea mays* e *Arachis hypogaea*. Resumos, XIV. Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Florianópolis SC . 1996. Resumo A - 007.
- Bezerra, A.M.E.; Medeiros Filho, S.; Oliveira, L.D.M. & Silveira, E.R. Produção e composição química da macela em função da época de colheita. *Horticultura Brasileira* 26: 026-029. 2008.
- Bishop, C.D. & Reagan, J. Control of the storage pathogen *Botrytis cinerea* on dutch white cabbage (*Brassica oleraceae* var. *Capitata*) by the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Journal of Essential Oil Research* 10: 57-60. 1998.
- Bishop, C.D. & Thornton, I.B. Evaluation of the antifungal activity on the essential oils of *Monarda citriodora* var. *citriodora* and *Melaleuca alternifolia* on post harvest pathogens. *Journal of Essential Oil Research* 9: 77-82. 1997.
- Blank, A. F. ; Fontes, S. M. ; Carvalho Filho, J. L. S. ; Alves, P. B. ; Silva-Mann, R. ; Mendonça, M. C. & Arrigoni-Blank, M. F. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 8: 73-78. 2005.
- Bonaldo, S.M.; Schwan-Strada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Cruz, M.E.S. & Fiori-Tutida, A.C.G. Contribuição ao estudo das atividades antifúngica e elicitoras de fitoalexinas em sorgo e soja por eucalipto (*Eucalyptus citriodora*). *Summa Phytopathologica* 33: 383-387. 2007.

- Boyce, A.M. Historical aspects of insecticide development. In: Metcalf, R. L. & Mckelvey Jr., J.J. The future for insecticides: needs and prospects. Proceedings of a Rockefeller Foundation Conference. New York. Wiley Interscience. 1974. pp. 469-488.
- Carta, C.; Moretti, M.D.L. & Peana, A.T. Activity of the oil of *Salvia officinalis* L. against *Botrytis cinerea*. Journal of Essential Oil Research 8: 399-404. 1996.
- Chaves, F. C. M. Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função de adubação orgânica e épocas de corte. Tese de Doutorado. Botucatu, SP. FCA/UNESP. 2002.
- Decker, S. Inseticidas Vegetais. São Paulo. Secretaria de Agricultura, Indústria e Comércio do Estado de São Paulo. 1942. pp.1-18. (Boletim da Agricultura, n. único).
- Di Stasi, L.C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: Di Stasi, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência – um guia interdisciplinar. São Paulo. Ed. UNESP. 1996. pp. 199-215.
- Faria, T.J.; Ferreira, R.S.; Yassumoto, L.; Souza, J.R.P.; Ishikawa, N.K. & Barbosa, A.M. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against Phytopathogenic fungi. Brazilian Archives of Biology and Tecnology 49: 867-871. 2006.
- Fiori, A.C.G.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Stangarlin, J.R.; Vida, J.B.; Scapin, C.A.; Cruz, M.E.S. & Pascholati, S.F. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. Journal of Phytopathology 148: 483-487. 2000.
- Gadelha, J.C.; Innecco, R.; Alcanfor, D.C.; Mattos, S.H.; Medeiros-Filho, S. & Vieira, A.V. Defensivos naturais no tratamento pós-colheita de pedúnculos do melão. Revista Ciência Agronômica 34: 5-10. 2003.
- Gros, E.G.; Pomilio, A.B.; Seldes, A.M. & Burton, G. Introducció al Estudio de los Productos Naturales. Washington. The General Secretariat of the Organization of the American States. 1985.
- Hornok, L. Influence of nutrition on the yield and content of active compounds in some essential oil plants. Acta Horticulturae 132: 239-247. 1983.
- Kishore, N.; Dubey, N. K.; Srivasta, O. P. & Sing, S. K. Volatile fungitoxicity in some higher plants as evaluated against *Rhizoctonia solani* and some other fungi. Indian Phytopathology 36: 724-726. 1983.
- Kishore, M.; Dixit, S. N. & Dubey, N. K. Fungitoxic studies with *Chenopodium ambrosioides* for control of dumping – off in *Phaseolus aureus* (MONG) caused by *Rhizoctonia solani*. Tropical Science 29: 171-176. 1989.
- Lo, C.L.; Weiergang, I.; Bonham, C.; Hipskind, J.; Wood, K. & Nicholson, R.L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of methyl ether of luteolinidin. Physiological and Molecular Plant Pathology 49: 21-31. 1996.
- Lobato, A.K.S.; Santos, D.G.C.; Oliveira, F.C.; Gouvea, D.D.S.; Torres, G.I.O.S.; Lima-Junior, J.A.; Oliveira-Neto, C.F. & Silva, M.H.L. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Revista Brasileira de Biociências 5: 915-917. 2007.
- Lopes, N.P.; Kato, M. J.; Andrade, E. H.; Maia, J. G. S. & Yoshida, M. Y. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. Phytochemistry 46: 689-693. 1997.
- Lopes, R. C.; Casali, V. W. D.; Barbosa, L. C. A. & Cecon, P. R. Influência de três regimes hídricos na produção de óleo essencial em sete acessos de *Polygonum punctatum* Ell. Revista Brasileira de Plantas Medicinais 3: 7-10. 2001.
- Mann, J. Secondary Metabolism. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford. Oxford Science Pubs. 1987.
- Mariconi, F.A.M. Inseticidas e seu Emprego no Combate às Pragas. v. 1. Defensivos. 5<sup>a</sup>. Ed. São Paulo. Nobel. 1981.
- Medice, R.; Alves, E.; Assis, R.T.; Magno-Junior, R.G. & Lopes, H.A.G.L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Ciência e Agrotecnologia 31: 83-90. 2007.
- Mishra, A.K. & Dubey, N.K. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. Applied and Environmental Microbiology 60: 1101-1105. 1994.
- Moraes, L. A. S.; Facanali, R.; Marques, M. O. M.; Ming, L.C. & Meireles, M. A. A. Phytochemical characterization of essential oil from *Ocimum selloi*. Anais da Academia Brasileira de Ciências 74:183-186. 2002.

- Mota, J.C.O. & Pessoa, M.N.G. Utilização de óleo essencial e extrato foliar de *Lippia sidoides* Cham. no controle de fungos de sementes de graviola. In: Resumos Expandidos, 36. Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Manejo Integrado de Doenças de Plantas, Uberlândia, MG. 2003. CD-ROM.
- Paulus, D.; Medeiros, S.L.P.; Santos, O.S. & Paulus, E. Solução nutritiva para produção de menta em hidroponia. Horticultura Brasileira 26: 61-67. 2008.
- Rodrigues, E.; Schwan-Estrada, K.R.F.; Fiori-Tutida, A.C.G.; Stangarlin, J.R. & Cruz, M.E.S. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de alface em sistemas de cultivo orgânico contra *Sclerotinia sclerotiorum* pelo extrato de gengibre. Summa Phytopathologica 33: 124-128. 2007.
- Saito, M.L. & Lucchini, F. Substâncias Obtidas de Plantas e a Procura por Praguicidas Eficientes e Seguros ao Meio Ambiente. Jaguariúna. Embrapa/CNPMA. 1998.
- Saito, M.L. & Scramin, S. Plantas Aromáticas e seu Uso na Agricultura. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2000.
- Salgado, A.P.S.P.; Cardoso, M.G.; Souza, P.E.; Souza, J.A.; Abreu, C.M.P. & Pinto, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. Ciência e Agrotecnologia 27: 249-254. 2003.
- Santos, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre. Ed. da UFRGS; Florianópolis. Ed. Ed. da UFSC. 1999. pp. 323-354.
- Silva, D.M.H. & Bastos, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. Fitopatologia Brasileira 32: 143-145. 2007.
- Simões, C. M. O. & Spitzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre. Ed. da UFRGS; Florianópolis. Ed. Ed. da UFSC. 1999. pp. 387-415.
- Simon, J. E.; Reiss-Bubenheim, D.; Jojy, R. J. *et al.* Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. Journal of Essential Oil Research 4: 71-75. 1992.
- Souza, J.R.P.; Moraes, H.; Caramori, P.H.; Jojannsson, L.A.P.S. & Miranda, L.V. Desenvolvimento da espinheira-santa sob diferentes intensidades luminosas e níveis de poda. Horticultura Brasileira 26: 40-44. 2008.
- Taiz, L. & Zeiger, E. Fisiologia Vegetal. 3ª. Ed. Porto Alegre. Ed. Artmed. 2004.
- Tatsadjieu, N.L.; Jazet Dongmo, P.M.; Ngassoum, M.B.; Etoa, F-X. & Mbofung, C.M.F. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries Food Control 20: 161-166. 2009.
- Vieira, P.C. & Fernandes, J.B. Plantas inseticidas. In: Simões, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre. Ed. da UFRGS; Florianópolis. Ed. Ed. da UFSC. 1999. pp. 739-754.
- Zanandrea, I.; Juliano, D.S.; Andréa, B.M.; Juliane, L. & Veridiana, K.B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimento micelial em placas. Revista Brasileira de Farmacognosia 14: 14-16. 2004.

## Capítulo 10

# Supressividade de Solo a *Meloidogyne* por *Pasteuria penetrans* nos Estados do Maranhão e Santa Catarina

Leandro Grassi de Freitas; Guilherme Silva de Podestá; Silamar Ferraz & Marcelo Magalhães Coutinho

*Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia 36570-000 Viçosa, MG, Brasil,  
e-mail: leandro@ufv.br*

## Introdução

Os nematóides parasitam as plantas cultivadas pelo homem há milhares de anos, mas as perdas que eles causam ficaram mais evidentes nas décadas de 1940 e 1950, com o desenvolvimento e a utilização de nematicidas fumigantes de solo, que elevaram a produtividade em razão de sua eficiência no controle desses patógenos. Em ambientes naturais e nos sistemas de cultivo orgânicos, as populações de nematóides tendem a se manter em equilíbrio com as de outros organismos. Entretanto, em situações de agricultura extensiva de monoculturas, com utilização de adubos altamente solúveis no lugar de matéria orgânica e o plantio durante todo o ano, possibilitado pela irrigação de grandes áreas, principalmente em regiões quentes e semiáridas, os nematóides tiveram sua importância aumentada como patógenos, chegando, em muitos casos, a inviabilizar o cultivo.

Entre os vários nematóides fitopatogênicos, os do gênero *Meloidogyne*, também conhecidos como nematóides das galhas, são considerados os mais importantes por parasitarem praticamente todas as culturas agrícolas comerciais. Esse hábito polífono dificulta seu controle por meio de rotação de culturas. O número limitado de cultivares resistentes disponíveis aos agricultores e a quebra de resistência, conferida pelo gene *Mi*, no campo em condições de altas temperaturas, reduzem as possibilidades de manejo sem o uso de nematicidas. Além do alto custo, os nematicidas, em muitos casos, não proporcionam controle efetivo. Além disso, o fato de poderem provocar câncer e outros problemas de saúde em seres humanos e outros animais resultaram na retirada de vários nematicidas do mercado e na demanda de alimentos isentos de resíduos de agrotóxicos. Dessa forma, métodos naturais de controle vêm sendo estudados de forma crescente, entre os quais se destaca o controle biológico.

Esse capítulo trata especificamente da utilização da bactéria Gram positiva formadora de endósporos, *Pasteuria penetrans*, para o controle biológico de nematóides das galhas e relata a experiência de sua utilização em culturas, localidades e condições edafo-climáticas distintas, por um período prolongado, possibilitando fazer considerações sobre o potencial prático dessa bactéria para o controle de *Meloidogyne* spp. em condições de campo no Brasil.

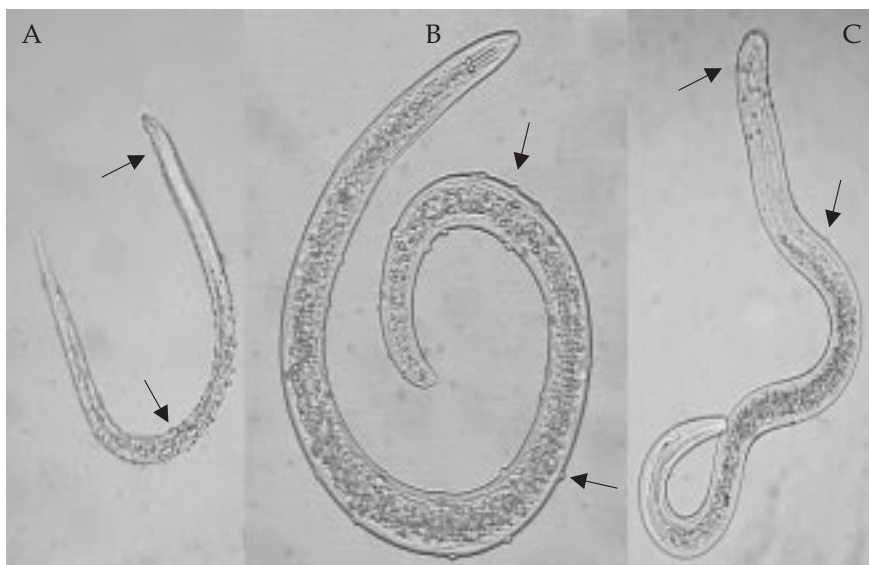
## ***Pasteuria penetrans* como Agente de Biocontrole**

Mais de 200 diferentes organismos são considerados inimigos naturais dos fitonematóides, como fungos, bactérias, nematóides predadores, ácaros e outros (Poinar & Jansson, 1988a, 1988a, b; Kerry, 1990). Entre esses, as bactérias do gênero *Pasteuria* Metchnikoff 1888 (Starr & Sayre, 1988) estão entre os mais estudados devido as suas características desejáveis como agressividade e rusticidade (Stirling, 1984; Brown *et al.*, 1985; Stirling, 1985; Sayre, 1986; Bird & Brisbane, 1988). A sobrevivência prolongada dos endósporos no solo, resistência ao calor e à dessecação, inocuidade ao homem e a outros animais e o possível uso em conjunto com práticas culturais são as principais vantagens deste microrganismo (Dutky & Sayre, 1978; Mankau, 1980; Stirling & Wachtel, 1980; Stirling *et al.*, 1986; Sayre & Starr, 1988; Stirling, 1988; Oostendorp *et al.*, 1990). A impossibilidade de cultivá-lo efetivamente em meio de cultura é o principal entrave para a sua produção em grande escala e comercialização.

Mais de 300 espécies de nematóides foram relatadas como sendo hospedeiras de *Pasteuria*. A espécie *Pasteuria penetrans* foi descrita por Sayre & Starr (1985) infectando *Meloidogyne incognita*, entretanto, outras espécies de *Meloidogyne* também são parasitadas (Gowen & Ahmed, 1990). Apesar de se considerar que essa bactéria possui um alto grau de especificidade (Davies *et al.*, 1992), um mesmo isolado de *Pasteuria penetrans* pode aderir e se reproduzir em diferentes populações, espécies e até mesmo gêneros de fitonematóides, causando supressividade. Dickson *et al.* (1994) e Carneiro *et al.* (1999) observaram um isolado de *Pasteuria* sp. obtido de *Pratylenchus scribneri* aderir-se a *Meloidogyne incognita*, *Meloidogyne arenaria*, *Meloidogyne hapla*, *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne mayaguensis*, *Meloidogyne paranaensis* e *Pratylenchus brachyurus*. Um isolado norte-americano de *Pasteuria* obtido de *Heterodera glycines* se aderiu mais prontamente a *Heterodera schachtii*, seu possível hospedeiro original (Atibalentja *et al.*, 2004). Uma mistura de isolados de *Pasteuria penetrans* procedentes de várias regiões brasileiras e multiplicada em populações de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* por mais de 10 anos, falhou em aderir-se a uma determinada população de *Meloidogyne javanica* e a *Meloidogyne mayaguensis* procedente de raízes de goiaba em Petrolina, PE, mas se aderiu a *Helicotylenchus dihystra* e *Pratylenchus brachyurus* em diferentes níveis (L.G. Freitas, observação pessoal, Figura 1). Isolados dos Estados Unidos (Mankau, 1975; Oostendorp *et al.*, 1990) e da China (Pan *et al.*, 1993) parasitaram *Meloidogyne* spp. e *Pratylenchus* spp. Um isolado indiano parasita *Meloidogyne* spp. e *Heterodera* spp., enquanto outro parasita *Heterodera* spp., *Globodera* spp. e *Rotylenchulus reniformis* (Bhattacharya & Swarup, 1988; Sharma & Davis, 1996). De acordo com Mankau &



Prasad (1972), *Pasteuria penetrans* foi capaz de reduzir simultaneamente a densidade populacional de *Meloidogyne javanica*, *Meloidogyne incognita* e *Pratylenchus scribneri* em tomate. É importante lembrar que por não ser possível cultivar *Pasteuria penetrans in vitro*, fica impossível assegurar a pureza das populações da bactéria e, por conseguinte, a adesão e o parasitismo cruzados podem ser resultado de mistura de isolados geneticamente heterogêneos de *Pasteuria penetrans* dentro de uma mesma população.



**Figura 1.** Endósporos de uma mistura de isolados de *Pasteuria penetrans* multiplicada em *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* por 10 anos, aderidos às cutículas de juvenis de *Meloidogyne incognita* (A), *Helicotylenchus dihystera* (B) e *Pratylenchus brachyurus* (C), em diferentes níveis. As setas apontam endósporos aderidos.

Outras três espécies de *Pasteuria* descritas parasitando fitonematóides são *Pasteuria thornei* em *Pratylenchus* spp., *Pasteuria nishizawae* em nematóides dos gêneros *Heterodera* e *Globodera* (Sayre & Starr, 1989) e a *Candidatus Pasteuria usgae* em *Belonolaimus longicaudatus* (Giblin-Davis *et al.*, 2003).

*Pasteuria penetrans* permanece dormente no solo por longos períodos na forma de endósporos até que o juvenil de segundo estágio do nematóide (J2), ao se locomover, entre em contato com os endósporos que se aderem à cutícula. Posteriormente, ao ser carregado para o interior da planta, ocorre a emissão de um tubo germinativo que perfura a parede do corpo do nematóide, atingindo o pseudoceloma. Esse tubo ramifica-se dicotomicamente formando um pseudomicélio septado que dá origem a microcolônias vegetativas, que se fragmentam e originam novas colônias. As células terminais dessas colônias engrossam-se e fragmentam-se dando origem aos endósporos que amadurecem no interior da fêmea (Mankau, 1975; Mankau & Imbriani, 1975). Mais de dois milhões de endósporos são produzidos em uma fêmea de *Meloidogyne* parasitada (Sturhan, 1985; Sayre *et al.*, 1991). Os endósporos são liberados com a morte e a decomposição da fêmea do nematóide e dispersam-se primariamente por percolação da água e por cultivo do solo (Sturhan, 1985).

O processo de redução da população de *Meloidogyne* spp. por *Pasteuria penetrans* se dá em duas etapas. Inicialmente, em solo com baixa concentração de endósporos da bactéria, os juvenis se encontram com poucos endósporos no seu caminho em busca da raiz e penetram a raiz com poucos endósporos aderidos a sua cutícula. Desta forma, a infectividade dos juvenis não é seriamente afetada (Brown & Smart, 1985; Davies *et al.*, 1988), porém as fêmeas resultantes desses juvenis não produzirão ovos pois a bactéria ganha a competição por nutrientes no interior da fêmea. Quando cada uma dessas fêmeas entra em senescência, cerca de dois milhões de endósporos de *Pasteuria penetrans* são liberados no solo. A segunda fase do controle do nematóide ocorre quando a concentração de endósporos da bactéria no solo é alta e muitos endósporos aderem-se aos juvenis, impedindo que eles se locomovam até as raízes e as penetrem (Stirling, 1984). Quando isto ocorre, considera-se que o solo tornou-se supressivo e a população do nematóide tende a cair drasticamente (Freitas, 1997).

A supressividade de um solo ocorre quando o fitonematóide e a planta hospedeira suscetível estão presentes num ambiente propício para a doença ocorrer, entretanto ela não ocorre ou, se ocorre, não é severa. *Pasteuria penetrans* é observada em solos supressivos a nematóides (Bird & Brisbane, 1988; Minton & Sayre, 1989; Dickson *et al.*, 1994; Weibelzahl-Fulton *et al.*, 1996) e tem suprimido nematóides em casa-de-vegetação e experimentos de microparcels (Stirling, 1984; Brown *et al.*, 1985; Rodríguez-Kábana *et al.*, 1986; Minton & Baujard, 1990; Davies *et al.*, 1991; Oostendorp *et al.*, 1991; De Leij *et al.*, 1992). Apesar desses relatos, é difícil determinar a extensão do papel de *Pasteuria penetrans* na supressão de doenças causadas por nematóides.

Stirling (1984) verificou que *Pasteuria penetrans* foi a responsável pelo declínio de nematóides das galhas em campos de cultivo de uva no sul da Austrália. Ao adicionar nematóides em vasos com solo de campo em estado natural ou autoclavado, ele observou que os nematóides se multiplicaram muito mais em solo autoclavado do que em solo natural, pois a autoclavagem inativou *Pasteuria penetrans*. Esse estudo serviu de base para o desenvolvimento de um bioensaio para estimar o grau de supressividade de um solo devido à ação de *Pasteuria penetrans* (Freitas *et al.*, 1995).

No campo, a adesão de endósporos e o desenvolvimento de *Pasteuria penetrans* em *Meloidogyne* spp. ocorrem de forma mais eficiente em temperaturas entre 25 °C e 30 °C (Stirling, 1981; Stirling *et al.*, 1990; Hatz & Dickson, 1992; Freitas, 1997). Stirling (1981) observou que a duração do seu ciclo de vida foi reduzida em cerca de 70% a 30 °C quando comparado a 20 °C. Isso é um indicativo de que *Pasteuria penetrans* é mais efetiva no controle do nematóide em condições de temperaturas mais altas.

Embora *Pasteuria penetrans* seja encontrada em vários tipos de solo, a maioria dos solos supressivos a nematóides devido à sua presença é de textura arenosa (Williams, 1960; Stirling & White, 1982; Spaul, 1984; Minton & Sayre, 1989; Giblin-Davis *et al.*, 1990; Minton & Baujard, 1990; Oostendorp *et al.*, 1990; Dickson *et al.*, 1994; Ko *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Weibelzahl-Fulton *et al.*, 1996; Freitas, 1997). Maitelle *et al.* (1995) observaram maior adesão em solos arenosos do que em solos argilosos. A maior movimentação dos J2 em solo arenoso do que em solo argiloso aumenta a possibilidade de contato entre J2 e os endósporos imóveis da bactéria. A maior percolação de água em solos arenosos faz com que endósporos aplicados na superfície

do solo atinjam as camadas mais profundas, onde se encontram os nematóides (Oostendorp *et al.* 1990). Tratos culturais como irrigação, aração e gradagem melhoram a distribuição de endósporos no campo, aumentando as chances de contato entre *Pasteuria penetrans* e os nematóides. Devido ao seu diminuto tamanho, endósporos desta bactéria são facilmente carregados por água em percolação no solo (Oostendorp *et al.*, 1990), o que facilita a sua aplicação no campo via água de irrigação. Mais informações sobre histórico, taxonomia, biologia e ecologia de *Pasteuria penetrans* podem ser encontradas na revisão de Chen & Dickson (1998) e de Freitas & Carneiro (2000).

## Produção de Inóculo da Bactéria para a Aplicação no Campo

Como nenhum método que permita a multiplicação *in vitro* de *Pasteuria penetrans* foi desenvolvido até o presente momento, apesar das tentativas de Williams *et al.* (1989) e de Bishop & Ellar (1991), sua produção ainda baseia-se no método descrito por Stirling & Wachtel (1980), no qual a bactéria cresce e multiplica-se no nematóide hospedeiro em plantas envasadas. Para possibilitar um controle efetivo, é necessário selecionar populações de *Pasteuria penetrans* com amplo espectro de hospedeiros ou aplicar misturas de isolados variados para contrapor a diversidade de populações do nematóide das galhas no campo (Stirling, 1985). Por isso, uma mistura de isolados de várias procedências do Brasil, infectando espécies e raças diferentes de *Meloidogyne* spp. é reproduzida em casas-de-vegetação em populações mistas do nematóide das galhas (Figura 2).



**Figura 2.** Sistema de multiplicação de *Pasteuria penetrans* *in vivo*, em casa-de-vegetação, com controle automático de irrigação por gotejamento.

Nesse método, J2s de *Meloidogyne* spp. carregando endósporos aderidos às suas cutículas são inoculados em tomateiros em casa-de-vegetação. Para aderir os endósporos de *Pasteuria penetrans* aos J2 antes da inoculação, uma suspensão de J2 de *Meloidogyne* spp. é obtida por meio de eclosão de ovos em funil de Baermann modificado. A coleta é feita por quatro dias e *Pasteuria penetrans* é adicionada à suspensão na forma de pó de raiz de tomate com a bactéria ou na forma de suspensão de endósporos obtida pelo esmagamento de fêmeas infectadas em água. O borbulhamento com ar da suspensão de endósporos e J2 de *Meloidogyne* spp., método desenvolvido por Bird (1986), é a forma mais usada para proporcionar a adesão na maioria dos J2 da suspensão, por ser simples e eficiente. A suspensão aquosa de *Pasteuria penetrans* com *Meloidogyne javanica* é ajustada para cerca de  $3 \times 10^8$  endósporos/J2 e borbulhada com o auxílio de uma bomba de aquário em frasco erlenmeyer por 12 a 18 h em temperatura ambiente de cerca de 25 °C. Após esse período, retira-se uma alíquota para se avaliar o número de endósporos aderidos por J2, em aproximadamente 20 juvenis. Ao se atingir média entre 6 e 10 endósporos/J2, ajusta-se a concentração de juvenis para inocular de 1500 a 2000 J2 por planta de tomate com cerca de 20 cm de altura. Os sistemas radiculares são removidos após 7 a 8 semanas, tempo suficiente para *Pasteuria penetrans* completar seu ciclo de vida e produzir endósporos maduros (Freitas & Carneiro, 2000), são lavados, secos ao ar, moídos e peneirados. O pó produzido serve como fonte de inóculo bacteriano (Stirling & Wachtel, 1980).

A concentração de endósporos no pó de raiz varia de acordo com a umidade, a temperatura, a textura e o teor de matéria orgânica do solo, assim como com o isolado de *Pasteuria penetrans*, a população do nematóide, a planta hospedeira, o número de nematóides por vaso e o número de endósporos/J2. Chen *et al.* (1996) inocularam plantas de tomate envasadas com J2 de *Meloidogyne arenaria* contendo  $4,9 \pm 2,0$  endósporos aderidos, em três aplicações de 1000 a 1500 J2/planta, em intervalos de uma semana, e obtiveram  $7,9 \times 10^7$  endósporos/g de pó de raiz. Gomes *et al.* (2002) introduziram em uma inoculação 2000 J2 de *Meloidogyne javanica* contendo média de 10 endósporos/J2 por planta de tomate e obtiveram  $6,25 \times 10^8$  endósporos/g de raiz.

## Bioteste de Supressividade do Solo

Nos testes para se determinar o nível de supressividade do solo por *Pasteuria penetrans* a metodologia utilizada é a seguinte: amostras compostas do solo de campo infestado com *Pasteuria penetrans* são coletadas e espalhadas em camada de 0,5 cm de altura, em bandejas sobre bancada de casa-de-vegetação, onde ficam por 60 dias para inativar os nematóides sem prejudicar a viabilidade da bactéria. O solo é então dividido em duas porções iguais e uma das porções é autoclavada por 1 h a 120 °C, em dois dias consecutivos. A outra porção não é autoclavada para manter a integridade de *Pasteuria penetrans*. Após a autoclavagem, as porções são distribuídas, separadamente, em copos de plástico com 300 ml de capacidade. Os solos dos copos são reumedecidos e, depois de 12 h, quando o solo estiver com cerca de 80% da capacidade de

campo, inoculam-se 1000 J2 de *Meloidogyne* sp. por copo. Deve-se utilizar a mesma espécie, ou até mesmo a população do nematóide-problema do campo, pois a adesão e multiplicação de um isolado de *Pasteuria penetrans* variam conforme a espécie do nematóide hospedeiro ou população com a mesma suscetibilidade da população de campo. Os copos são colocados em câmara de crescimento a 28 °C, no escuro, e tampados com papel alumínio para não perderem umidade. Após três dias são transferidos para a casa-de-vegetação, distribuídos sobre bancada em delineamento inteiramente ao acaso e uma muda de tomate 'Marglobe' ou 'Santa Cruz' (ou outra variedade suscetível aos nematóides das galhas) é transplada por copo. Os tomateiros são conduzidos por 45 a 65 dias em casa de vegetação, dependendo da temperatura, ou seja, tempo suficiente para os nematóides produzirem galhas e massas de ovos nas raízes. Posteriormente, avalia-se o número de endósporos aderidos por nematóide, em 30 J2 observados por copo e os números de ovos e de galhas por sistema radicular. O número médio de ovos/planta do tratamento não autoclavado é dividido pelo número médio de ovos/planta do tratamento autoclavado, subtraído de um e multiplicado por 100. Esta é a porcentagem dos ovos que *Pasteuria penetrans* está reduzindo no solo de campo. O mesmo deve ser feito para o número de galhas/planta. Essas medidas podem ser interpretadas como o nível de supressividade do solo.

## A Experiência em Jaborandi no Maranhão

O jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) é uma planta medicinal brasileira que contém o alcalóide pilocarpina, sintetizado nas raízes e translocado para as folhas, de onde é extraído e comercializado na forma de colírio para o tratamento de glaucoma. O jaborandi passou a ser cultivado com alta tecnologia, adensadamente e em linha, em plantios irrigados por pivôs centrais em fazenda da empresa farmacêutica alemã Merck, no município de Barra do Corda, Maranhão (Figura 3), de forma que a coleta das folhas é feita quinzenalmente por tratores equipados com implementos especiais que mantêm a planta em estatura baixa. Sob condições de altas temperaturas, água abundante durante todo o ano e solo extremamente arenoso com menos de 1% de matéria orgânica, o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* se proliferou causando enormes galhas radiculares em grande número de plantas. As principais consequências do ataque do nematóide nessa cultura foram o menor desenvolvimento das plantas e a queda do teor de pilocarpina nas folhas coletadas, comprometendo a produção do medicamento. Como o cultivo da planta medicinal impedia o uso de nematicidas químicos e a grande extensão de área com solo com até 99% de areia inviabilizava a introdução de matéria orgânica, como esterco de gado, para o controle do nematóide, pois ela rapidamente se mineralizava não chegando a reduzir a população de nematóides, decidiu-se testar o controle biológico pela bactéria *Pasteuria penetrans*. O acompanhamento periódico da população de *Pasteuria penetrans* se fez com o objetivo de se avaliar o potencial dessa bactéria em tornar o solo supressivo ao nematóide das galhas em região quente e com solo arenoso.



**Figura 3.** Cultivo de jaborandi irrigado por pivô central em Barra do Corda, MA.

*Pasteuria penetrans* foi aplicada ao solo em 1996, em suspensão aquosa de pó de raiz com o uso de pulverizador costal, de forma a resultar numa concentração de  $10^3$  endósporos/g de solo nos primeiros 20 cm de profundidade, em uma área de  $170 \text{ m}^2$  dentro de uma reboleira no campo. Esta área representa uma pequena parcela de um plantio de 102,4 ha de jaborandi, irrigado por um pivô central e infestado por *Meloidogyne javanica*. Três quartos dessa área foram amostrados sistematicamente em 240 pontos em 1998, e constatou-se que 72,8% dos juvenis de segundo estágio do nematóide (J2) continham endósporos aderidos à cutícula, com média de 4,5 endósporos/J2 (medido em 20 J2 por talhão, 12 talhões por pivô). A grande porcentagem de juvenis com endósporos de *Pasteuria penetrans* aderidos indica o grande poder de disseminação dessa bactéria dentro de uma área irrigada por pivô central, que é submetida a grande volume de água, que faz os endósporos se moverem por percolação e também submetida a grande trânsito humano para capina e de máquinas para colheita.

O baixo número de endósporos aderidos por juvenil não afeta grandemente sua locomoção. Desta forma, a infectividade dos juvenis não é seriamente afetada (Brown & Smart, 1985, Davies *et al.*, 1988) e ele pode penetrar na planta hospedeira e desenvolver-se até a maturidade, mas as fêmeas não produzirão ovos. Em 1999, a média de endósporos por J2 havia subido para 20, o que indica que o solo começava a ficar supressivo, impossibilitando os J2 de se locomoverem normalmente e penetrarem nos sistemas radiculares do jaborandi, criando novas galhas (Stirling, 1984). Nesse ano se observou redução dos sintomas de amarelecimento das folhas a ponto de não ser mais possível a detecção de reboleiras. Isso talvez se deva ao intenso lançamento de novas raízes pelo jaborandi, e ao fato dessas raízes não estarem sendo intensamente parasitadas pelo nematóide.

Em avaliação de J2 extraídos do solo em dezembro de 1999, constatou-se que dos poucos extraídos, cerca de metade deles tinha endósporos aderidos e que em cerca de 1/3 deles o número variava de 80 a 150 endósporos/J2. Nessa ocasião as plantas de jaborandi não mais apresentavam sintomas de amarelecimento e subcrescimento causados pelo nematóide. Considerando-se a baixa quantidade inóculo de *Pasteuria penetrans* aplicada ao solo e o pequeno tamanho das áreas tratadas, a sua distribuição uniforme pelas áreas irrigadas por dois pivôs centrais mostra a grande capacidade de disseminação da bactéria, o que confirma sua característica de colonizadora agressiva de solo (Davies *et al.*, 1991; Oostendorp *et al.*, 1991; Kasumimoto *et al.*, 1993). Acredita-se que a textura arenosa do solo, aliada ao trânsito intenso de máquinas, pessoas e animais na área garantiram a boa disseminação da bactéria. Altas temperaturas, culturas que toleram alta reprodução do nematóide, água em abundância e alta capacidade de disseminação de *Pasteuria penetrans* são fatores que favorecem a multiplicação da bactéria e a elevação de sua densidade populacional no solo. Segundo Kasumimoto *et al.* (1993), mesmo densidades iniciais muito baixas de endósporos no solo podem aumentar, em condições ideais, ao ponto de tornarem o solo supressivo ao nematóide. Dickson *et al.* (1994) só observaram reduções na população de *Meloidogyne arenaria* em amendoim em microparcelas no campo a partir de dois anos da inoculação. Os autores argumentam que se densidade mais alta de endósporos fosse aplicada, a população de nematóides decresceria mais rapidamente.

Biotestes foram realizados de 1999 a 2004, em casa-de-vegetação da Universidade Federal de Viçosa, com amostras compostas de solo coletadas na área infestada onde *Pasteuria penetrans* foi aplicada em 1996, seguindo a metodologia descrita, com sete repetições por tratamento em delineamento inteiramente casualizado. Os números de galhas e de ovos por sistema radicular de tomateiro foram avaliados após cultivo por cerca de 50 dias, em solos naturais e em solos autoclavados, nos quais a bactéria foi morta e suas proteínas responsáveis por adesão, desnaturadas, não exercendo assim atividade sobre o nematóide alvo (Tabela 1).

**Tabela 1.** Supressividade por *Pasteuria penetrans* (*Pp*) em solo de campo cultivado com jaborandi e infestado com *Meloidogyne javanica*.

Ano da avaliação	Número de galhas		Redução (%)	Número de ovos		Redução (%)
	solo autoclavado ( <i>Pp</i> inativa)	solo não autoclavado ( <i>Pp</i> ativa)		solo autoclavado ( <i>Pp</i> inativa)	solo não autoclavado ( <i>Pp</i> ativa)	
1999	34,5**	13,6	60,6	1412,0	146,0	89,7
2000	213,0	87,2	59,1	4798,0	975,1	79,7
2002	196,7	34,8	82,3	4020,0	310,8	92,3
2004	383,1	163,9	57,2	3962,3	1211,9	69,4

\*\*As médias de tratamento na mesma linha e dentro das colunas de número de galhas ou de número de ovos diferem entre si pelo teste de F a 1% de probabilidade, em todos os anos de realização de biotestes, com sete repetições por tratamento.

Em 1997, outra área irrigada da mesma fazenda, também de 102,4 ha e plantada com jaborandi, recebeu aplicação de *Pasteuria penetrans* em cerca de 15 ha. Nesta área também a bactéria se espalhou rapidamente e se multiplicou no campo tornando o solo supressivo. Mesmo após oito anos da aplicação de *Pasteuria penetrans*, o nematóide *Meloidogyne javanica* não voltou a ser problema, pois sua população continua baixa em ambas as áreas onde a bactéria foi aplicada. O nível de pilocarpina voltou ao normal e as plantas não exibem sintomas novos do ataque do nematóide (José Senna, pesquisador da Merck, comunicação pessoal), constituindo esse um excelente exemplo de manejo sustentável do nematóide, sem a utilização de nematicidas químicos.

## A Experiência em Fumo em Santa Catarina

Em Santa Catarina, o setor fumageiro tem importância econômica e social. Quarenta e sete mil produtores rurais catarinenses produzem fumo (*Nicotiana tabacum*) e têm nesta cultura uma das principais fontes de renda familiar. A atividade é desenvolvida em pequenas propriedades rurais, sendo que a área média de plantio é de dois hectares por propriedade. A renda bruta de um hectare de fumo atinge R\$4.000,00, ao passo que o milho e o feijão rendem R\$600,00/ha (Icepa, 2008). Boa parte da renda bruta do fumo acaba constituindo-se em receita para os produtores, pois grande parte do custo de produção é remuneração da mão-de-obra, normalmente familiar. A fumicultura é desenvolvida na maior parte dos municípios catarinenses. O estado de Santa Catarina é o segundo maior produtor de fumo do Brasil, com mais de 30% da produção. Os nematóides das galhas *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* estão entre os maiores problemas fitossanitários da cultura, causando 15% de perdas em média (Sasser, 1989). Cultivares resistentes a *Meloidogyne incognita* são fornecidas aos agricultores cooperados de algumas empresas tabageiras, mas não existe material resistente aos outros nematóides das galhas que atacam a cultura. O controle químico com fumigantes era feito por alguns agricultores na fase de sementeira, quando as mudas são produzidas diretamente no solo, mas esse método não é viável economicamente para o controle no campo. Quando o fumo é plantado em rotação com feijão, o problema tende a se agravar com o passar dos anos, e a rotação com milho parece não ser suficiente para a redução das altíssimas populações que se formam no campo ao final do ciclo da cultura, que apresenta grande número de galhas em suas raízes (Figura 4).

O objetivo desse estudo foi acompanhar a dinâmica populacional dos nematóides e da bactéria em período prolongado de tempo e determinar se a textura do solo influenciaria no desenvolvimento da supressividade do solo cultivado com fumo em Santa Catarina. *Pasteuria penetrans* foi introduzida em campos de cultivo de fumo na região de Tubarão, SC (Tabela 2), em áreas com solos com texturas diferentes (Tabela 3) e infestadas por *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*, determinada pela análise de eletroforese de isoenzimas presentes nas fêmeas. As propriedades foram escolhidas por histórico de ocorrência de plantas de fumo com galhas radiculares. Em outubro de 2000, cerca de 15 dias após o transplântio das mudas para o campo, aplicou-se a bactéria nas propriedades B, com solo 93% de



areia, e C, com solo com 54% de areia (Tabela 3). Em outubro de 2001, as aplicações incluíram as propriedades A (92% de areia) e D (69% de areia). Aplicações anuais foram feitas em 1.000 plantas centrais por parcela de 2.000 plantas, na quantidade de 6 g de pó de raiz contendo  $7,0 \times 10^8$  endósporos/g, suspensos em 20 l de água e aplicados por pulverizador costal sem bico em jato contínuo nos pés das plantas nas linhas de plantio, por dois anos consecutivos em cada área (Figura 5).



**Figura 4.** Galhas causadas por *Meloidogyne javanica* em raiz de fumo em Santa Catarina.

**Tabela 2.** Propriedades produtoras de fumo em Santa Catarina que receberam aplicações de *Pasteuria penetrans* e suas localizações.

Propriedade	Localidade, Município
A	Barro Vermelho, Maracajá
B	Sanga do Veado, Araranguá
C	Rio Acima, Içara
D	Linha Batista, Criciúma

**Tabela 3.** Composição textural dos solos das propriedades em Santa Catarina nas quais *Pasteuria penetrans* foi aplicada.

Propriedade	Areia Grossa	Areia Fina	Silte e Argila	
			Silte	Argila
	(dag/kg)			
A	50	42	3	5
B	23	70	1	6
C	13	41	28	18
D	26	43	12	19



**Figura 5.** Aplicação de *Pasteuria penetrans* em campo de produção de fumo via pulverização costal de suspensão de endósporos ao lado da linha de plantio.

Avaliações de campo para estimar o índice de galhas foram feitas em 2004, 2005 e 2007, em 50 plantas por parcela. Em 2006 essas avaliações não puderam ser feitas por problemas climáticos de excesso de chuva, encharcamento das áreas e podridão radicular generalizada. Durante a avaliação, após o arranquio de cada planta, três pessoas davam nota de 0 a 10 de acordo com o nível de galhas radiculares, sendo 0 = sem galhas, 1 = cerca de 10% das raízes com galhas, 2 = cerca de 20% das raízes com galhas, e assim por diante até 10 = 100% das raízes com galhas. A média do índice de galhas de cada planta foi calculada pelas notas individuais das três pessoas (Tabela 4). Após cada avaliação, foi coletado solo da região radicular de cada planta e colocado num saco que, no final constituiu uma amostra composta do experimento para posterior realização de bioteste em casa-de-vegetação. Em janeiro de 2006, um bioteste foi feito como descrito, com o solo coletado em dezembro de 2005, mas não indicou diferença de supressão em relação à textura dos solos. No bioteste de 2007, as reduções dos números de galhas e de ovos por sistema radicular foram significativamente maiores em solos de textura arenosa, como as das áreas A e B, do que nos solos de textura menos arenosa, com maior teor de argila, de C e D, confirmando o indicado na literatura (Mateille *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Chen & Dickson, 1998).

**Tabela 4.** Índice de galhas causadas por *Meloidogyne* spp. nas raízes de plantas de fumo avaliado em áreas de campo onde *Pasteuria penetrans* foi aplicada, em Santa Catarina.

Propriedade	Índice de Galhas (0 - 10)		
	2004	2005	2007
A	2,8	3,7	1,0
B	0,8	2,1	1,8
C	0,9	0,5	1,3
D	0,3	0,8	0,0

**Tabela 5.** Redução do número de ovos de *Meloidogyne javanica* e de galhas em raízes de tomate em bioteste de supressividade de solo coletado em áreas de campo onde *Pasteuria penetrans* foi aplicada, em Santa Catarina.

Propriedade	Redução do número de ovos/sistema radicular (%)		Redução do número de galhas/sistema radicular (%)	
	2006	2007	2006	2007
	A	35,1	76,1	30,5
B	29,5	96,4	49,2	82,7
C	15,3	14,2	34,6	21,8
D	73,4	20,4	43,5	24,4

## Análise Comparativa das Experiências no Maranhão e em Santa Catarina

A reprodução de *Pasteuria penetrans* ocorreu muito bem em solos arenosos no Maranhão e em Santa Catarina, resultando em supressividade de solo, ao passo que em solos com maior teor de argila em Santa Catarina, a supressividade não ocorreu com a mesma intensidade. O clima quente do Maranhão contribuiu para o rápido desenvolvimento de solo supressivo, em dois anos, ao passo que em Santa Catarina, com outonos e invernos marcados por baixas temperaturas, o desenvolvimento da supressividade se deu de forma mais lenta. Essa diferença climática resultou em diferença na densidade populacional do nematóide no solo das duas localidades, que foi alta durante o ano todo no Maranhão e apresentava picos de alta no final do cultivo do fumo, apenas uma vez por ano, caindo drasticamente no inverno. Como *Pasteuria penetrans* depende do encontro de seus endósporos com os J2 no solo para aderir-se e multiplicar-se, o desenvolvimento da supressividade só ocorre em solos altamente infestados pelo nematóide hospedeiro. Desta forma, todas as condições que favoreçam o desenvolvimento do nematóide são importantes para a reprodução de *Pasteuria penetrans*.

A alta infestação do solo e o cultivo de uma planta perene no Maranhão, no caso o jaborandi, foi fundamental para a rápida multiplicação da bactéria que pode completar cerca de dez ou mais ciclos de vida por ano. Como em cada ciclo cerca de dois milhões de endósporos são produzidos por fêmea de *Meloidogyne* spp. parasitada, alta concentração da bactéria no solo deve ter ocorrido após dois ou três anos da primeira aplicação. Em microparcelas plantadas com amendoim a campo, Chen *et al.* (1996) observaram que foi necessária uma concentração de 10.000 endósporos/g de solo de *Pasteuria penetrans*, para que uma aplicação da bactéria reduzisse em 65% o número de galhas de *Meloidogyne arenaria* raça 1, logo no primeiro ciclo da planta. Uma concentração de 100.000 endósporos/g de solo foi necessária para reduzir em 95% o número de galhas. No segundo ano, sem a reaplicação de *Pasteuria penetrans*, as reduções foram de 82% e 90% para as concentrações de 10.000 e 100.000 endósporos/g de solo, respectivamente, demonstrando que a bactéria pode ser inoculada em concentrações mais baixas do que a ideal e que esta concentração pode ser atingida após algum tempo com a multiplicação da bactéria em nematóides no campo (Chen *et al.*, 1996).

Os resultados observados no Maranhão confirmam os de Dickson *et al.* (1994), que só observaram reduções na população de *Meloidogyne arenaria* em amendoim em microparcelas no campo a partir de dois anos da inoculação.

Segundo Stirling (1991) existem duas estratégias de aplicação de *Pasteuria penetrans* no campo para o controle do nematóide das galhas. A forma inundativa consiste em aplicações frequentes e em grande número de endósporos para reduzir a população de nematóides de forma direta e imediata. Entretanto, como não há produção satisfatória dessa bactéria *in vitro*, sua multiplicação ocorre *in vivo* em tomates inoculados com juvenis contendo endósporos aderidos, em casa-de-vegetação. Esta produção massal é lenta e laboriosa, resultando em pouco inóculo da bactéria. Portanto, *Pasteuria penetrans* tem sido aplicada de forma inoculativa em experimentos de campo, isto é, poucos endósporos da bactéria são aplicados em suspensão sobre o solo ao redor dos sistemas radiculares e ocorre a multiplicação da bactéria na população de nematóides infestando o solo. Mesmo densidades baixas de endósporos no solo podem aumentar, em condições ideais, ao ponto de tornarem o solo supressivo ao nematóide (Kasumimoto *et al.*, 1993).

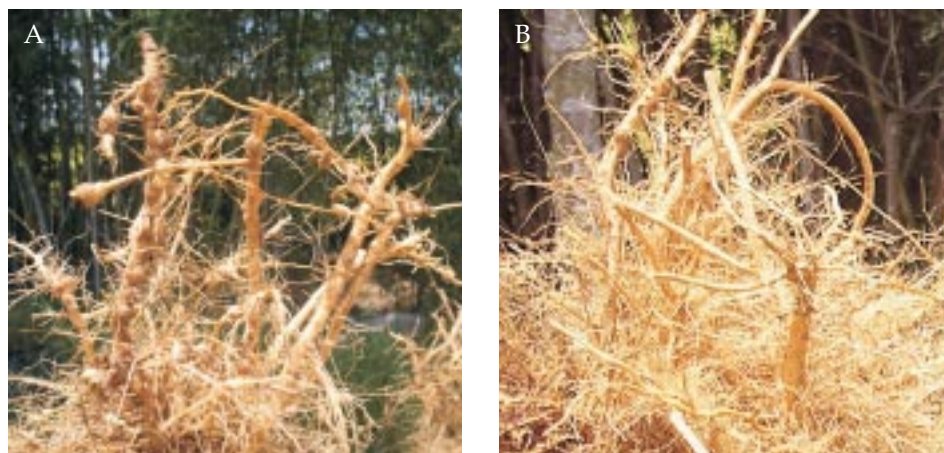
A pequena queda do nível de supressão observado no último bioteste com solo do Maranhão pode ser devido a uma redução da concentração de endósporos no solo após a quase extinção do nematóide no campo. Endósporos de *Pasteuria penetrans* podem ser lixiviados em solos arenosos por água de chuva ou de irrigação, atingindo camadas mais fundas do solo, onde não se encontram os nematóides. Dabiré *et al.* (2007) observaram em condições experimentais que 53% dos endósporos introduzidos em solo arenoso percolaram com o fluxo de água enquanto apenas 14% percolaram no solo areno-argiloso e apenas 0,1% no solo argiloso. Como *Meloidogyne javanica* não voltou a ser problema nas áreas irrigadas onde *Pasteuria penetrans* foi aplicada no Maranhão, acredita-se que as populações do nematóide e da bactéria antagonista entraram em equilíbrio, com população residual de ambos no solo. A presença da bactéria em condições tão favoráveis ao seu desenvolvimento possivelmente seja suficiente para impedir a elevação da população do nematóide das galhas acima do nível de dano, como ocorria antes da aplicação de *Pasteuria penetrans*.

Em Santa Catarina, o efeito de *Pasteuria penetrans* sobre as populações dos nematóides das galhas (*Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*) foi menos impactante do que no Maranhão pelo fato de a bactéria não encontrar condições tão favoráveis ao seu desenvolvimento, pois as populações iniciais dos nematóides não eram tão altas como no Maranhão e na região sul as temperaturas são baixas em parte do ano o que prolonga em muito o ciclo de vida da bactéria. Mesmo assim, foi possível observar o desenvolvimento de supressividade dos nematóides das galhas em fumo em solos com textura mais arenosa, com grandes diferenças de número de galhas por sistema radicular entre plantas em solo infestado com *Pasteuria penetrans* e não infestado, tanto em biotestes (Figura 6) como em avaliação do índice de galhas no campo (Figura 7). É importante relatar que a média do índice de galhas de áreas da propriedade A que não receberam *Pasteuria penetrans* em 2005 foi de 9,0 enquanto em área com *Pasteuria penetrans* foi de 3,7 (Tabela 4), o que representa quase 60% menos infecção pelo nematóide, certamente resultando em maior produtividade. No bioteste de 2007 houve 61,7% menos galhas em solo com *Pasteuria*

*penetrans* do que no solo autoclavado (Tabela 5 e Figura 6), confirmando o fenômeno observado no campo em 2005. Em 2007, em áreas da propriedade B que não receberam *Pasteuria penetrans*, o índice de galhas médio foi de 6,5 enquanto onde se aplicou *Pasteuria penetrans* foi de 1,8, representando 72% a menos de galhas (Figura 7). O bioteste resultou em redução de 82,7%, mas foi feito com população pura de *Meloidogyne incognita*, com comprovada compatibilidade com a população utilizada de *Pasteuria penetrans*. No campo várias populações de várias espécies de *Meloidogyne* podem ocorrer, com menor ou nenhuma compatibilidade com a bactéria utilizada, reduzindo a eficiência do controle biológico. Gomes *et al.* (2006) relataram a ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em fumo na localidade de Içara, região de estudo, causando severos danos à plantação. Não se sabe se por existência de populações mistas do nematóide ou por desuniformidade de distribuição da bactéria, mesmo em áreas supressivas, é comum encontrar grupos de plantas com índice médio de galhas. Em condições semelhantes de clima, em Santa Catarina, o solo arenoso foi mais favorável para *Pasteuria penetrans* do que o argiloso. A textura do solo é um fator determinante para o desenvolvimento do nematóide das galhas, pois afeta sua distribuição entre o solo e as raízes da planta hospedeira (Mateille *et al.*, 1995). Endósporos de *Pasteuria penetrans* também se distribuem melhor em solo arenoso, portanto a textura mais leve facilita a movimentação e migração dos nematóides às raízes e aumentam as chances de encontro com os endósporos da bactéria (Prot, 1979; Mateille *et al.*, 1995). Entretanto, a presença de argila em solos arenosos parece impedir a percolação de endósporos das camadas superficiais para aquelas mais profundas (Mateille *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Sistemas radiculares de tomate ao final do bioteste onde a planta à esquerda foi cultivada em amostra de solo de campo (propriedade A com 92% de areia) tratada com *Pasteuria penetrans* e infestada com *Meloidogyne incognita* e a da direita foi cultivada em amostra do mesmo solo, porém autoclavada duas vezes antes da infestação com o nematóide. A diferença no número de galhas é resultado da supressão do nematóide das galhas pela bactéria.



**Figura 7.** Sistemas radiculares de fumo arrancadas do solo no final do ciclo da cultura, mostrando sintomas de galhas e poucas radículas em planta desenvolvida no solo sem *Pasteuria penetrans* (A) e ausência de sintomas em planta desenvolvida em área onde *Pasteuria penetrans* tornou o solo supressivo (B). Fotos tiradas na propriedade A (solo com 92% de areia), em Sanga do Veado, Araranguá, SC, no ano de 2007.

O desenvolvimento diferencial de *Pasteuria* de acordo com a textura do solo também foi observado por Gomes *et al.* (2002). Não foi possível determinar a causa da supressividade de solo indicada nos biotestes ter ficado maior no solo da propriedade D do que no da C, mas supõe-se que o fato de o solo da propriedade D conter o dobro de areia grossa e menos da metade de silte em relação ao solo da propriedade C possa ser uma explicação (Tabela 3).

O acompanhamento da dinâmica populacional de *Pasteuria penetrans* em propriedades particulares de agricultores é dificultada por vários fatores. Por viverem da produção em suas áreas e mudarem de cultivares de acordo com indicações das empresas tabageiras com quem eles mantêm contrato (sendo que ocorreu mudança de cultivares durante o período em estudo, para outros resistentes a *Meloidogyne incognita* e, segundo alguns agricultores, com níveis de resistência a *Meloidogyne javanica*), as condições experimentais não foram ideais, e, por isso, muitas vezes foi impossível fazer análises estatísticas por falta de continuidade. Entretanto, devido ao período prolongado e observações frequentes, pode-se observar alguns comportamentos que, no âmbito geral, confirmam as informações disponíveis na literatura.

## Considerações Finais

O controle de fitonematóides por meio químico é limitado devido à inexistência de produtos eficazes e de baixo custo que não agridam a saúde humana e o ambiente. O grande potencial de *Pasteuria penetrans* como uma das mais poderosas armas contra os nematóides das galhas, principalmente em

regiões tropicais e subtropicais, vem sendo demonstrado em vários estudos que enfocam biologia, ecologia e biocontrole exercido pela bactéria. Algumas características como resistência às condições extremas de umidade e temperatura, sobrevivência prolongada na ausência do hospedeiro no solo, longa vida de armazenamento na forma de inóculo de pó de raiz, compatibilidade com outros métodos de controle e grande capacidade de disseminação, fazem com que seu uso como nematicida biológico seja muito desejado por agricultores e profissionais da área agrícola. Além disso, a especificidade de alguns isolados a nematóides fitoparasitas impede a atuação da bactéria em nematóides de vida livre, importantes na reciclagem da matéria orgânica e nas cadeias alimentares da microbiota do solo.

Por outro lado, a falta de um meio de cultura para crescimento *in vitro* impede a produção em larga escala da bactéria. Quando a multiplicação de *Pasteuria penetrans* for realizada a contento em meio de cultura, talvez em tanques de fermentação, como preconizada por Hewlett *et al.* (2002), grande quantidade de inóculo estará disponível para aplicação no campo, atingindo rapidamente concentrações perto de 100.000 endósporos/g de solo e funcionando como um verdadeiro bionematicida. Entretanto, a produção *in vivo*, em nematóides, é relativamente simples e pode corresponder a obtenção de quantidades significativas de endósporos que, se aplicados numa estratégia inoculativa, em condições ideais para o desenvolvimento da bactéria, proporcionarão o aumento gradual de *Pasteuria penetrans* no solo, reduzindo o número de nematóides abaixo do nível de dano econômico.

O avanço da irrigação para regiões com solos arenosos e altas temperaturas acarretam infestações generalizadas por espécies de *Meloidogyne*, gerando perdas na produtividade, principalmente onde variedades suscetíveis são cultivadas, a exemplo do que vem ocorrendo em grandes áreas do nordeste, centro-oeste e sudeste do Brasil. O cultivo em casa-de-vegetação também favorece o aumento de populações dos nematóides das galhas, onde estes se tornam fator limitante. As condições de ambiente, tidas como propícias ao ataque de nematóides, são também consideradas ideais para o desenvolvimento de seu antagonista, *Pasteuria penetrans*. Portanto, se essa bactéria for aplicada ao solo em quantidades insuficientes para o controle imediato do nematóide, o agricultor poderá lançar mão de outras medidas de manejo, como cultivares tolerantes ou solarização, até que ela se espalhe e atinja alta densidade populacional no solo.

*Pasteuria penetrans* não é a solução para todos os problemas gerados pelos nematóides. Seus efeitos não são tão rápidos como os dos potentes nematicidas, que dizimam populações de campo imediatamente após a sua aplicação, mas em contrapartida, não apresentam perigo ao homem e ao ambiente e não tem que ser reaplicada a cada cultivo, tornando seu uso mais econômico e sustentável. O caráter imediatista no controle de *Meloidogyne* spp. deve ceder lugar a métodos alternativos, racionais e eficientes, pelo menos até que o cultivo *in vitro* de *Pasteuria penetrans* seja resolvido. Em resumo, *Pasteuria penetrans*, usada isoladamente ou em combinação com outros métodos, é uma importante ferramenta no manejo dos nematóides das galhas.

## Referências

- Atibalentja, N.; Jakstys, B.P. & Noel, G.R. Life cycle, ultrastructure, and host specificity of the North American isolate of *Pasteuria* that parasitizes the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology* 36: 171-180. 2004.
- Battacharya, D. & Swarup, G. *Pasteuria penetrans*, a pathogen of the genus *Heterodera*: Its effect on nematode biology and control. *Indian Journal of Nematology* 18: 61-70. 1988.
- Bird, A.F. The influence of the actinomycete, *Pasteuria penetrans*, on the host-parasite relationship of the plant-parasitic nematode, *Meloidogyne javanica*. *Parasitology* 93: 571-580. 1986.
- Bird, A.F. & Brisbane, P.G. The influence of *Pasteuria penetrans* in field soils on the reproduction of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie* 11: 75-81. 1988.
- Bishop, A.H. & Ellar, D.J. Attempts to culture *Pasteuria penetrans* *in vitro*. *Biocontrol Science and Technology* 1: 101-114. 1991.
- Brown, S.M. & Smart Jr., G.C. Root penetration by *Meloidogyne incognita* juveniles infected with *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology* 17: 123-126. 1985.
- Brown, S.M.; Kepner, J.L. & Smart Jr., G.C. Increased crop yields following application of *Bacillus penetrans* in field plots infested with *Meloidogyne incognita*. *Soil Biology and Biochemistry* 17: 483-486. 1985.
- Carneiro, R.M.D.G.; Randig, O.; Freitas, L.G. & Dickson, D.W. Attachment of endospores of *Pasteuria penetrans* to males and juveniles of *Meloidogyne* spp. *Nematology* 1: 267-271. 1999.
- Chen, Z.X. & Dickson, D.W. Review of *Pasteuria penetrans*: Biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology* 30: 313-340. 1998.
- Chen, Z.X.; Dickson, D.W.; McSorley, R.; Mitchell, D.J. & Hewlett, T.E. Suppression of *Meloidogyne arenaria* race 1 by soil application of endospores of *Pasteuria penetrans*. *Journal of Nematology* 28: 159-168. 1996.
- Dabiré, R.K.; Ndiayeb, S.; Mounportc, D.; Mateille, T. Relationships between abiotic soil factors and epidemiology of the biocontrol bacterium *Pasteuria penetrans* in a root-knot nematode *Meloidogyne javanica*-infested field. *Biological Control* 40: 22-29. 2007.
- Davies, K.; Robinson, G.M.P. & Laird, V. Proteins involved in the attachment of a hyperparasite, *Pasteuria penetrans*, to its plant-parasitic nematode host, *Meloidogyne incognita*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 18-23. 1992.
- Davies, K.G.; Kerry, B.R. & Flynn, C.A. Observations on the pathogenicity of *Pasteuria penetrans*, a parasite of root-knot nematodes. *Annals of Applied Biology* 112: 491-501. 1988.
- Davies, K.G.; De Leij, F.A.A.M. & Kerry, B.R. Microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes in tropical agriculture. *Tropical Pest Management* 37: 303-320. 1991a.
- Davies, K.G.; Laird, V. & Kerry, B.R. The motility, development and infection of *Meloidogyne incognita* encumbered with spores of the obligate hyperparasite *Pasteuria penetrans*. *Revue de Nématologie* 14: 611-618. 1991b.
- De Leij, F.; Davies, K.G. & Kerry, B.R. The use of *Verticillium chlamydosporium* Goddard and *Pasteuria penetrans* (Thorne) Sayre & Starr alone and in combination to control *Meloidogyne incognita* on tomato plants. *Fundamental and Applied Nematology* 15: 235-242. 1992.
- Dickson, D. W.; Oostendorp, M.; Giblin-Davis, R.M. & Mitchell, D.J. Control of plant-parasitic nematodes by biological antagonists. In: Rosen, D.; Bennett, F. D. & Capinera, J.L. (Eds.) *Pest Management in the Subtropics. Biological Control - A Florida perspective*. London. Intercept. 1994. pp. 575-601.
- Dutky, E.M. & Sayre, R.M. Some factors affecting infection of nematodes by the bacterial spore parasite *Bacillus penetrans*. *Journal of Nematology* 10: 285. 1978. (Abstract).
- Freitas, L.G. The effects of soil solarization, organic amendment, and fumigant nematicides on *Pasteuria penetrans* and its infectivity to *Meloidogyne arenaria* race 1 in tomato. Ph.D. Thesis. Davis. University of Florida. 1997.
- Freitas, L.G.; Mitchell, D.J. & Dickson, D. W. Bioassay for determining the density of endospores of *Pasteuria penetrans* in field soil. *Nematropica* 25: 88. 1995. (Abstract).
- Freitas, L.G. & Carneiro, R.M.D.G. Controle biológico de nematóides por *Pasteuria* spp. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Ed.). *Controle Biológico*. Vol. 2. Jaguariuna SP. Embrapa Meio Ambiente. 2000. pp. 197-216.



- Giblin-Davis, R.M.; Williams, D.S.; Bekal, S.; Dickson, D.W.; Brito, J.A.; Becker, J.O. & Preston, J. F. '*Candidatus Pasteuria usgae*' sp. nov., an obligate endoparasite of the phytoparasitic nematode *Belonolaimus longicaudatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 197-200. 2003.
- Giblin-Davis, R.M.; McDaniel, L.L. & Bilz, F.G. Isolates of the *Pasteuria penetrans* group from phytoparasitic nematodes in bermudagrass turf. *Journal of Nematology* 22: 750-762. 1990.
- Gomes, C.B.; Lima, D.L. & Carneiro, R.M.D.G. Ocorrência de *Meloidogyne mayaguensis* em fumo (*Nicotiana tabacum*) no estado de Santa Catarina. *Anais, 26. Congresso Brasileiro de Nematologia, Campos dos Goytacases, RJ. 2006. p. 88.*
- Gomes, C.B.; Freitas, L.G.; Ferraz, S.; Oliveira R.D.L. & Silva, R.V. Influência do esterco bovino no substrato sobre a multiplicação de *Pasteuria penetrans* em tomateiro. *Nematologia Brasileira* 26: 59-65. 2002.
- Gomes, C.B.; Freitas, L.G.; Ferraz, S.; Oliveira R.D.L. & Scivittaro, W.B. Produção massal de *Pasteuria penetrans in vivo* em solos de diferentes texturas. *Nematologia Brasileira* 26: 131-140. 2002.
- Gowen, S.R. & Ahmed, R. *Pasteuria penetrans* for control of pathogenic nematodes. *Aspects of Applied Biology* 24: 25-32. 1990.
- Hatz, B. & Dickson, D.W. Effect of temperature on attachment, development, and interaction of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 24: 512-521. 1992.
- Hewlett, T.E.; Gerber, J. F.; Smith, K.S. & White, J.H. *In vitro* culture of *Pasteuria penetrans*. *Nematology* 25: 152-153. 2002. (Abstract).
- Icepa. Disponível em: [http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/opiniaio/analise\\_fumo.htm](http://cepa.epagri.sc.gov.br/agroindicadores/opiniaio/analise_fumo.htm). Acesso em: 25 fev. 2008.
- Kasumimoto, T.; Ikeda, R. & Kawada, H. Ose response of *Meloidogyne incognita* infected cherry tomatoes to application of *Pasteuria penetrans*. *Japanese Journal of Nematology* 23: 10-17. 1993.
- Kerry, B.R. An assessment of progress toward microbial control of plant parasitic nematodes. *Journal of Nematology* 22: 621-631. 1990.
- Ko, M. P.; Bernard, E.C.; Schmitt, D.P. & Sipes, B.S. Occurrence of *Pasteuria*-like organisms on selected plant-parasitic nematodes of pineapple in the Hawaiian islands. *Journal of Nematology* 27: 395-408. 1995.
- Mankau, R. *Bacillus penetrans* n. comb. causing a virulent disease of plant-parasitic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology* 26: 333-339. 1975.
- Mankau, R. Biological control of *Meloidogyne* populations by *Bacillus penetrans* in West Africa. *Journal of Nematology* 12: 230. 1980. (Abstract).
- Mankau, R. & Imbriani, J.L. The life cycle of an endoparasite in some tylenchid nematodes. *Nematologica* 21: 89-94. 1975.
- Mankau, R. & Prasad, N. Possibilities and problems in the use of a sporozoan endoparasite for biological control of plant-parasitic nematodes. *Nematropica* 2: 7. 1972. (Abstract).
- Mateille, T.; Duponnois, R. & Diop, M. . Influence of abiotic soil factors and the host plant on the infection of phytoparasitic nematodes of the genus *Meloidogyne* by the actinomycete parasitoid *Pasteuria penetrans*. *Agronomie* 15: 581-591. 1995.
- Minton, N.A. & Baujard, P. Nematode parasites of peanut. In: Luc, M.; Sikora, R.A. & Bridge, J. (Eds.) *Plant-parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture*. Wallingford. CAB International. 1990. pp. 285-320
- Minton, N.A. & Sayre, R.M. Suppressive influence of *Pasteuria penetrans* in Georgia soils on reproduction of *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 21: 574-575. 1989. (Abstract).
- Oostendorp, M.; Dickson, D.W. & Mitchell, D.J. Host range and ecology of isolates of *Pasteuria* spp. from the southeastern United States. *Journal of Nematology* 22: 525-531. 1990.
- Oostendorp, M.; Dickson, D.W. & Mitchell, D.J. Population development of *Pasteuria penetrans* on *Meloidogyne arenaria*. *Journal of Nematology* 23: 58-64. 1991.
- Pan, C.; Lin, J.; Ni, Z. & Wang, S. Study on the pathogenic bacteria parasitizing root-knot nematodes discovered in China and their application to biological control. *Acta Microbiologica Sinica* 33: 313-316. 1993.
- Poinar Jr., G.O. & Jansson, H. (Eds.) *Diseases of Nematodes*. Vol. 1. Boca Raton. CRC Press. 1988a.
- Poinar Jr., G.O. & Jansson, H. (Eds.) *Diseases of Nematodes*. Vol. 2. Boca Raton. CRC Press. 1988b.

- Rodríguez-Kábana, R.; Weaver, C.F.; Robertson, D.G. & Snoddy, E.L. Population dynamics of *Meloidogyne arenaria* juveniles in a field with Florunner peanut. *Nematropica* 16: 185-196. 1986.
- Sasser, J.N. Plant-Parasitic Nematodes: The farmer's hidden enemy. Raleigh NC. University Graphics North Caroline State University. 1989.
- Sayre, R.M. Pathogens for biological control of nematodes. *Crop Protection* 5: 268-76. 1986.
- Sayre, R.M. & Starr, M.P. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom. rev., comb. n., sp. n., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant parasitic nematodes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 52: 149-165. 1985.
- Sayre, R.M. & Starr, M.P. Bacterial disease and antagonism of nematodes. In: Poinar, G.O. & Jansson, H.B. (Eds.) *Diseases of Nematodes*. Vol. 1. Boca Raton. CRC Press. 1988. pp.69-101.
- Sayre, R.M. & Starr, M.P. Genus *Pasteuria* Metchnikoff 1888, 166<sup>Al</sup> emend. Sayre and Starr 1985, 149, Starr and Sayre 1988a, 27 (Nom. Cons. Opin. 61 Jud. Comm. 1986, 119). Not *Pasteuria* in the sense of Henrici and Johnson (1935), Hirsch (1972), or Staley (1973); see Starr *et al.* (1983) and Judicial Commission (1986). In: Williams, S.T.; Sharpe, M.E. & Holt, J.G. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Baltimore. Williams and Wilkins. 1989. pp. 2601-2615.
- Sayre, R.M.; Wergin, W.P.; Schmidt, J.M. & Starr, M.P. *Pasteuria nishizawae* sp. nov. a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. *Research in Microbiology* 142: 551-564. 1991.
- Sharma, S.B. & Davies, K.G. Characterization of *Pasteuria* isolated from *Heterodera cajani* using morphology, pathology, and serology of endospore. *Systematic and Applied Microbiology* 19: 106-112. 1996.
- Spaull, V.W. Observations on *Bacillus penetrans* infecting *Meloidogyne* in sugarcane fields in South Africa. *Revue de Nématologie* 7: 277-282. 1984.
- Starr, M.P. & Sayre, R.M. *Pasteuria thornei* sp. nov. and *Pasteuria penetrans* sensu stricto emend, mycelial and endospore-forming bacteria parasitic, respectively, on plant-parasitic nematodes of the genera *Pratylenchus* and *Meloidogyne*. *Annals of the Institute Pasteur of Microbiology* 139: 11-31. 1988.
- Stirling, G.R. Effect of temperature on infection of *Meloidogyne javanica* by *Bacillus penetrans*. *Nematologica* 27: 458-462. 1981.
- Stirling, G.R. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathology* 74: 55-60. 1984.
- Stirling, G.R. Host specificity of *Pasteuria penetrans* within the genus *Meloidogyne*. *Nematologica* 31: 203-209. 1985.
- Stirling, G.R. Biological control of plant parasitic nematodes. In: Poinar, G.O. & Jansson, H.B. (Eds.) *Diseases of Nematodes*. Vol. 2. Boca Raton. CRC Press. 1988. pp. 93-139
- Stirling, G.R. Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Progress, problems, and prospects. Wallingford. CAB International. 1991.
- Stirling, G.R. & Wachtel, M.F. Mass production of *Bacillus penetrans* for the biological control of root-knot nematodes. *Nematologica* 26: 308-312. 1980.
- Stirling, G.R. & White, A.M. Distribution of a parasite of root-knot nematodes in South Australian vineyards. *Plant Disease* 66: 52-53. 1982.
- Stirling, G.R.; Bird, A.F. & Cakurs, A.B. Attachment of *Pasteuria penetrans* spores to the cuticles of root-knot nematodes. *Revue de Nématologie* 9: 251-260. 1986.
- Stirling, G.R.; Sharma, R.D. & Perry, J. Attachment of *Pasteuria penetrans* to the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* in soil and its effects of the infectivity. *Nematologica* 36: 246-252. 1990.
- Sturhan, D. Untersuchungen über Verbreitung und Wirte des Nematodenparasiten *Bacillus penetrans*. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. 226: 75-93. 1985.
- Weibelzahl-Fulton, E.; Dickson, D.W. & Whitty, E.B. Suppression of *Meloidogyne incognita* and *M. javanica* by *Pasteuria penetrans* in field soil. *Journal of Nematology* 28: 43-49. 1996.
- Williams, J.R. Studies on the nematode soil fauna of sugarcane fields in Mauritius. 5. Notes upon a parasite of root-knot nematodes. *Nematologica* 5: 37-42. 1960.
- Williams, A.B.; Stirling, G.R.; Hayward, A.C. & Perry, J. Properties and attempted culture of *Pasteuria penetrans*, a bacterial parasite of root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*). *Journal of Applied Bacteriology* 67: 145-156. 1989.

## Capítulo 11

# **Monitoramento de *Trichoderma atroviride* SC1 em um Vinhedo no Nordeste da Itália: Considerações sobre Impacto Ambiental e Controle Biológico de *Armillaria mellea***

Claudia Maria Oliveira Longa, Federica Savazzini & Ilaria Pertot

*Safecrop Centre, Fondazione Edmund Mach, Via E. Mach 1, 38010, San Michele all'Adige, Trento, Italia, e-mail: claudia.longa@iasma.it, ilaria.pertot@iasma.it*

## **Introdução**

Fungos pertencentes ao gênero anamórfico *Trichoderma* são extensivamente mencionados na literatura científica como eficazes agentes de controle biológico de fitopatógenos. Vários produtos comerciais à base de espécies deste gênero foram desenvolvidos para utilização em casa-de-vegetação e em campo (Elad, 2000; Harman, 2000; Paulitz & Bélenger, 2001; Howell, 2003). *Trichoderma atroviride* P. Karst é utilizado no controle biológico de um grande número de patógenos de importantes culturas (Dodd *et al.*, 2003). A atividade antagonista de isolados desta espécie é atribuída ao efeito sinérgico de vários mecanismos, como competição por nutrientes, produção de enzimas que degradam a parede celular e antibiose (Lu *et al.*, 2004; Brunner *et al.*, 2005).

*Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm, causador de doença radicular e também de podridão de colo em florestas, pomares, árvores ornamentais e arbustos em todos os continentes (Fox, 2000), está se tornando um problema crescente em locais onde o plantio de videiras foi estabelecido em áreas anteriormente ocupadas por florestas, ambiente de ocorrência natural deste fungo (Baumgartner, 2004). No Trentino, região do nordeste da Itália, onde vinhedos são cultivados há séculos e se tornou a mais importante cultura com cerca de 10.000 ha plantados, a armilariose preocupa os produtores e causa danos na produção (Pertot *et al.*, 2008).

A recomendação de controle da armilariose é feita no sentido de minimizar a quantidade do inóculo inicial do patógeno na plantação, por meio da remoção dos restos de vegetais infectados e de tratamentos químicos (Raziq & Fox, 2004). Como estes métodos nem sempre são eficazes para o controle deste fungo, agentes de controle biológico têm sido estudados como uma alternativa no manejo integrado para o controle da doença.

Considerando-se que, mesmo na ausência da planta hospedeira, *Armillaria mellea* sobrevive por diversos meses em restos vegetais lenhosos como tocos, galhos ou raízes em decomposição no solo, um provável antagonista, para ser usado no controle de infecções causadas por este patógeno, deve apresentar como características indispensáveis a capacidade de colonizar o solo e de competir com outros microrganismos da rizosfera, bem como apresentar boa produção de inóculo, ser resistente ou tolerante a outros antagonistas, germinar e crescer rapidamente, invadindo e ocupando substratos orgânicos e sobreviver e se manter ativo no solo por longos períodos (Hagle & Shaw, 1991).

Em se tratando de organismos vivos, os agentes de biocontrole dependem principalmente das condições do ambiente, que exercem grande influência sobre as suas atividades (Benitez *et al.*, 2004). As condições ambientais afetam não só a sobrevivência dos antagonistas, como também influenciam na eficácia de sua ação antagonista contra os patógenos (Shaban & El-Komi, 2000). Assim, o conhecimento da adaptação ecofisiológica de um antagonista às condições do ecossistema onde deverá atuar é imprescindível para o estabelecimento de um programa eficaz de controle biológico.

Do ponto de vista ecológico, o monitoramento dos microrganismos antagonistas utilizados em condições de campo é de fundamental importância para a avaliação dos seus impactos no ecossistema.

O levantamento de dados relativos à capacidade de colonização, sobrevivência, disseminação e mecanismos de dispersão nas condições ambientes do sítio de introdução é parte integrante da avaliação de impacto ambiental decorrente da utilização de agentes de biocontrole. Na União Européia esta avaliação é obrigatória para todos os produtos de origem biológica e regulamentada pela legislação (European Parliament, 1991).

Embora as espécies de *Trichoderma* sejam consideradas seguras ao ambiente e não agressivas ao homem e demais organismos não-alvos, o destino delas no ecossistema ainda não é conhecido. Este estudo teve como objetivos o monitoramento da sobrevivência e da dispersão horizontal e vertical de conídios de *Trichoderma atroviride* SC1 no solo, bem como, a sua dispersão do solo ao aparato foliar de videiras no nordeste da Itália.

O isolado de *Trichoderma atroviride*, denominado SC1, é originário de lenho de avelã em decomposição e apresenta capacidade de controlar vários patógenos, sendo particularmente eficaz no controle da podridão das raízes em videiras causada por *Armillaria mellea* (Pertot *et al.*, 2008). O isolado SC1 foi depositado na coleção restrita do Centraalbureau voor Schimmelcultures sob o número CBS 122089 para patente (Pertot *et al.*, 2008).

## **Metodologias Utilizadas para Avaliar o Controle Biológico de *Armillaria mellea* e o Impacto Ambiental do Antagonista**

Os experimentos foram conduzidos em um vinhedo localizado no vale do rio Adige (Trentino, nordeste da Itália), no período de 15 de maio a 17 de setembro de 2006. O solo é classificado como franco arenoso e na camada de 0-20 cm apresenta: 663 g/kg de areia; 317 g/kg de silte; 20 g/kg de argila; pH (H<sub>2</sub>O) = 7,78; Mg = 207 mg/kg; K = 235 mg/kg; P = 78 mg/kg; N = 1,7 mg/kg; matéria orgânica = 27 g/kg. O índice pluviométrico médio semanal foi de 18,8 mm e a temperatura do solo a 10 cm de profundidade variou entre 15,3 e 25 °C (<http://meteo.iasma.it/meteo/>).

A comunidade de *Trichoderma* indígena no solo foi avaliada em 30 amostras de 10 g de solo, por meio de diluição em série, sendo que 1 ml da diluição 1:1000 foi disposta na superfície do meio Batata Dextrose Ágar (PDA; Oxoid, Cambridge, UK) com adição de 50 µg/g cloranfenicol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 µg/g de estreptomicina (Sigma-Aldrich) e 100 µg/g de rosa de bengala (Sigma-Aldrich). As placas de Petri foram mantidas a 25 °C e foram contadas as unidades formadoras de colônia (UFCs) de *Trichoderma* (Rifai, 1969). O meio de cultura semi-seletivo descrito foi utilizado para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) em todos os experimentos.

Estudos ecofisiológicos *in vitro* revelaram que o isolado SC1 apresenta um alto grau de adaptação às variações ambientais. Este fungo cresce numa amplitude de temperatura de 10 a 30 °C, com temperatura ótima de 25 °C. Além disso, é capaz de tolerar diversos níveis de pH (1 a 10), porém o seu crescimento é reduzido em condições de alcalinidade (pH=8). O crescimento micelial ótimo é observado com valores de potencial hídrico igual a 0,998, sendo significativamente reduzido com valores abaixo de 0,990. O isolado também é capaz de utilizar várias substâncias como fonte de carbono e nitrogênio para o seu crescimento micelial (Longa *et al.*, 2008).

O inóculo de *Trichoderma atroviride* SC1 foi obtido cultivando-o em meio de arroz (Gams *et al.*, 1998) a uma temperatura de 25 °C durante 21 dias. Os conídios do fungo apresentavam viabilidade de aproximadamente 100%.

A quantidade de UFC de *Trichoderma atroviride* SC1 no solo, em todos os experimentos, foi determinada no meio de cultura semi-seletivo. As colônias de *Trichoderma atroviride* foram diferenciadas das demais colônias de *Trichoderma* com base nas suas características morfológicas. Para uma inequívoca identificação do isolado SC1, 10% das colônias identificadas como *Trichoderma atroviride*, em cada placa, foram analisadas com base molecular utilizando “primers” e “Taq-Man probe set” baseado em uma mutação do gene Endochitinase (*Ech42*) que é altamente específica para o *Trichoderma atroviride* SC1 (Savazzini *et al.*, 2008).

**Sobrevivência e migração vertical no solo.** Foram demarcadas dez áreas medindo  $0,6 \times 0,6$  m e localizadas entre plantas nas fileiras de videira. Cinco áreas foram infestadas com 500 g do inóculo de *Trichoderma atroviride* SC1, o qual foi misturado ao solo até aproximadamente 3 cm de profundidade. A concentração inicial de inóculo no solo foi estimada em  $1,2 \times 10^8$  UFC/g de solo. As cinco áreas restantes serviram como controle. Para a amostragem do solo a diferentes profundidades, a parte externa de cada área foi escavada de modo a expor o perfil do solo. As amostras foram feitas na superfície e a 10, 20, 30 e 40 cm de profundidade, utilizando-se um tubo esterilizado (3 cm Ø, 50 ml). As coletas foram feitas no momento da infestação e na 1<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, 9<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semana após a infestação. Uma subamostra (1 g) de cada solo coletado foi removida utilizando uma colher esterilizada e transferida para provetas contendo 10 ml de solução Tween 80 (Acros Organics, Geel, Belgium) a 0,01%, colocadas em um agitador (Heidolph Instruments, Schwabach, Germany) por quatro minutos e deixadas decantar por um minuto. Em seguida foi realizada uma série de diluição em água destilada esterilizada, após a qual as suspensões foram plaqueadas no meio de cultura semi-seletivo. As placas de Petri assim preparadas foram mantidas a 25 °C por 5 dias e o número de colônias determinado nas placas que continham a diluição mais adequada, ou seja, aquelas que continham de 30 a 300 UFCs. Foram feitas três repetições para cada amostra de solo. Os resultados foram expressos em log UFC/g de solo seco. A identificação das colônias de *Trichoderma* foi feita como descrito. A sobrevivência e dispersão de *Trichoderma atroviride* SC1 no solo foi também determinada pela contagem do número de cópias do DNA genômico, utilizando o método de “*Real-Time PCR*”. Para essas análises foram utilizadas duas subamostras independentes de cada solo coletado. A extração do DNA do fungo no solo e a análise PCR foram realizadas como descrito por Savazzini *et al.* (2008).

**Dispersão e sobrevivência no ambiente.** Para o estudo da dispersão de conídios de *Trichoderma atroviride* SC1 no solo, foram feitas covas medindo  $0,3 \times 0,3 \times 0,3$  m nos espaços entre as videiras e preenchidas com uma mistura de solo e inóculo de *Trichoderma* (400 g/cova). A concentração inicial do inóculo foi estimada em  $1,6 \times 10^6$  UFC/g de solo. Outras dez covas foram feitas e preenchidas com o mesmo solo, porém não infestadas com o antagonista. Uma videira (‘Pinot gris on Kober 5BB’) de um ano de idade foi transplantada em cada cova. O monitoramento foi feito em dois períodos. Na primeira amostragem, realizada após nove semanas da introdução do microrganismo no solo, as amostras foram coletadas nas covas e a 0,5 e 2,0 m de distância (para cada ponto, o solo foi coletado na superfície e a 10 e 30 cm de profundidade). Na segunda amostragem, realizada 18 semanas após a infestação, as amostras de solo foram coletadas na superfície das covas e a 2,0 e 4,0 m de distância destas (a coleta do solo e o tratamento das amostras seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente). A dispersão do antagonista foi avaliada em termos de concentração de conídios (UFC/g de solo) e frequência (percentual de amostras do solo com ao menos uma UFC).

A migração do fungo do solo para as folhas das videiras transplantadas nas covas foi avaliada na 10<sup>a</sup> semana do experimento. Foram coletadas três folhas do ápice e da base de cada planta, as quais foram transferidas para tubos contendo 30 ml de solução aquosa esterilizada de Tween 80 a 0,01%. Estes tubos foram agitados por três minutos e 1 ml da suspensão foi transferido para placas de Petri contendo o meio

semi-seletivo, determinando-se o número de UFC de *Trichoderma atroviride* SC1 e de *Trichoderma* spp., nativo da área após sete dias. A área foliar foi calculada utilizando o programa de análise e processamento de imagem, Image Tool versão 2,0 (UTHSCSA, San Antonio, TX, USA). Os resultados foram expressos em UFC/mm<sup>2</sup> de folha.

No final do experimento, as plantas foram removidas das covas e o solo que não estava fortemente aderido às raízes foi eliminado agitando-as delicadamente. As raízes de cada planta foram envolvidas separadamente em um saco plástico e vigorosamente agitadas para desprender o solo da rizosfera (Paulitz & Bélenger, 2001). Uma subamostra de solo (1 g) da rizosfera de cada planta foi coletada e contada a população de *Trichoderma atroviride* SC1.

Para avaliar a capacidade do isolado SC1 de *Trichoderma atroviride* em promover o crescimento vegetal, realizou-se duas medidas, após nove e 18 semanas da infestação do microrganismo ao solo, determinando-se para cada planta a altura e o número de ramos e de folhas, O peso seco das raízes foi determinado ao final do experimento.

## **Resultados da Sobrevivência, Migração Vertical no Solo e Dispersão no Ambiente do Isolado SC1 de *Trichoderma atroviride***

**Sobrevivência e migração vertical no solo.** A análise preliminar do solo coletado antes da introdução do antagonista revelou a ocorrência de outros isolados do gênero *Trichoderma* em 12% das amostras avaliadas. Estes isolados foram identificados como pertencentes às espécies *Trichoderma virens*, *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma rossicum*. A concentração destes isolados no solo variou de  $1 \times 10^1$  a  $3,9 \times 10^2$  UFC/g de solo. As espécies de *Trichoderma* presentes na área apresentaram características morfológicas diversas que possibilitaram a diferenciação entre estas e o isolado introduzido na área, o que permitiu a contagem das UFCs de *Trichoderma atroviride* SC1. Entretanto, um número significativo de colônias identificadas como pertencente ao *Trichoderma atroviride* SC1 foi analisado utilizando método molecular para confirmar a identificação morfológica das colônias. *Trichoderma atroviride* SC1 sobreviveu nas condições ambientais do vinhedo durante o período de monitoramento (Figura 1), apresentando uma alta concentração de conídios na superfície do solo ( $1,15 \times 10^6$  UFCs/g de solo seco) até 18 semanas após a sua incorporação ao solo. Após a primeira semana da introdução ao solo, *Trichoderma* SC1 migrou rapidamente para as camadas mais profundas do solo, tendo sido isolado nas amostras coletadas a 10, 20, 30 e 40 cm de profundidade. A migração apresentou um gradiente de concentração com uma maior quantidade de UFCs na superfície, decrescendo com a profundidade do solo. A concentração de UFCs detectadas foi de aproximadamente  $8,7 \times 10^5$  UFCs/g de solo seco a 10 cm de profundidade do solo,  $3,8 \times 10^4$  UFCs/g de solo seco a 20 cm e  $1 \times 10^3$  UFCs/g de solo seco a 30 e 40 cm de profundidade.

Após um ano da sua introdução, *Trichoderma atroviride* SC1 foi isolado nas áreas tratadas em uma concentração de UFCs similar àquela encontrada para a população de outras espécies de *Trichoderma* de ocorrência natural naquele ambiente.

Os resultados obtidos com o método “Real-Time PCR” confirmaram a ausência do isolado SC1 no vinhedo antes do início do experimento e a sua persistência no solo após a introdução. Os resultados da quantificação da população de *Trichoderma atroviride* SC1 pelo método de diluição em série e molecular foram equiparáveis, exceto para a profundidade de 10 cm do solo, na 18ª semana do experimento. A relação linear entre os resultados obtidos com os dois métodos (Figura 2) apresentou um alto coeficiente de correlação de Person ( $r = 0,82$ ).

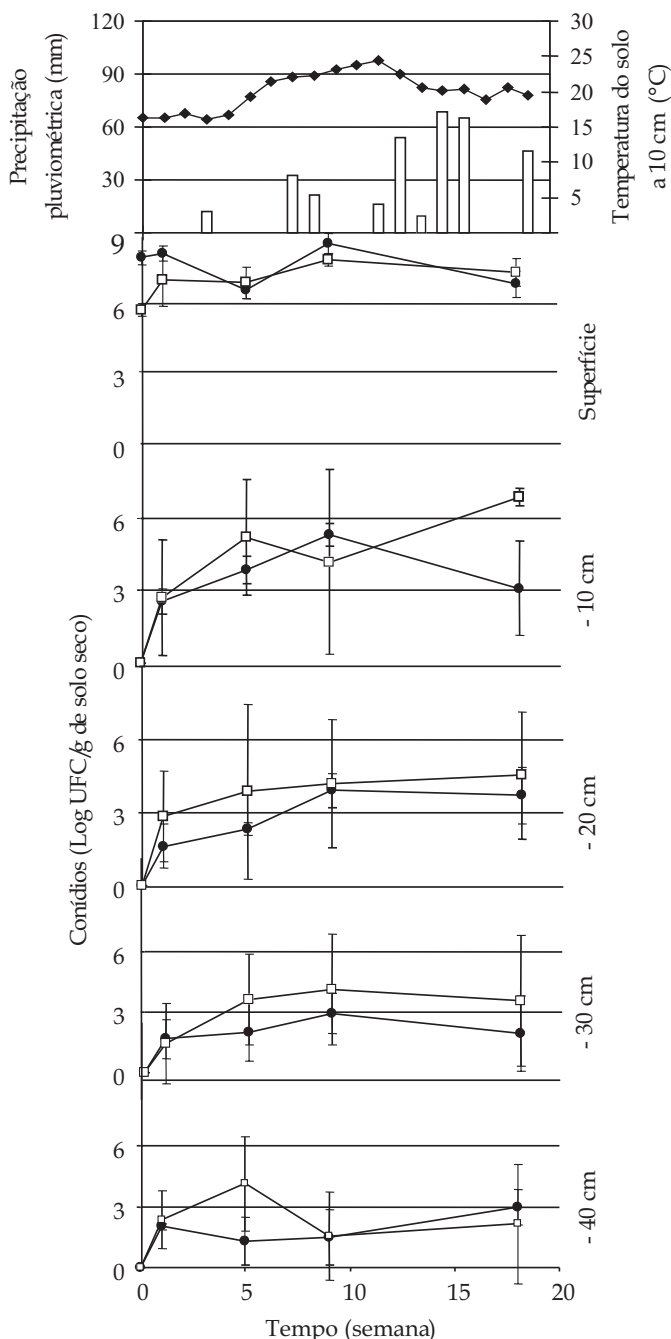
**Dispersão no ambiente.** A concentração de *Trichoderma* spp. nas áreas não tratadas variou entre 0 e  $10^3$  UFCs/g de solo seco e este número não foi significativamente diferente quando comparados com os resultados obtidos na superfície e nas profundidades de 10 e 30 cm do solo. A quantificação de *Trichoderma* spp. nativo na área não tratada foi utilizada para comparar o nível de colonização da área pelo isolado SC1 que foi introduzido. O resultado do monitoramento na 9ª semana após a introdução demonstrou que *Trichoderma atroviride* SC1 se dispersou a uma distância de 0,5 e 2,0 m da área tratada, na superfície do solo e nas profundidades de 10 e 30 cm. A concentração de UFCs do isolado SC1, nas amostras coletadas a uma distância de 0,5 e 2,0 m da área tratada, tanto na superfície quanto a 10 cm de profundidade do solo, foi significativamente maior que a concentração de UFCs das espécies nativas de *Trichoderma* na superfície do solo nas áreas não tratadas.

A concentração do isolado SC1 foi também significativamente maior que a população nativa de *Trichoderma*, quando foram analisadas as amostras provenientes de uma profundidade de 30 cm do solo, coletadas a distância de 0,5 m da área tratada. Mas, não foi significativamente diferente na mesma profundidade a uma distância de 2,0 m da área tratada. A frequência de ocorrência de *Trichoderma atroviride* SC1 foi de 100% nas amostras coletadas a 0,5 m de distância das áreas tratadas em todas as profundidades analisadas, decrescendo, nas amostras coletadas a 2,0 m da área tratada, para 90, 70 e 30%, respectivamente na superfície e a 10 e 30 cm de profundidade do solo. Após 18 semanas da sua introdução, o isolado SC1 foi detectado na superfície do solo à distância de 2,0 e 4,0 m da área tratada. Porém, a sua concentração não diferiu da concentração de *Trichoderma* spp. nativas da área não tratada. Apesar da baixa concentração do isolado SC1 detectada no solo após a 18ª semana de sua introdução, a frequência de ocorrência do fungo permaneceu alta, sendo de 80 e 70%, respectivamente, a 2,0 e 4,0 m de distância da área tratada. Após 18 semanas do plantio, a concentração de *Trichoderma atroviride* SC1 na rizosfera das videiras plantadas em covas tratadas com este isolado foi de  $1,2 \times 10^6$  UFC/g de solo.

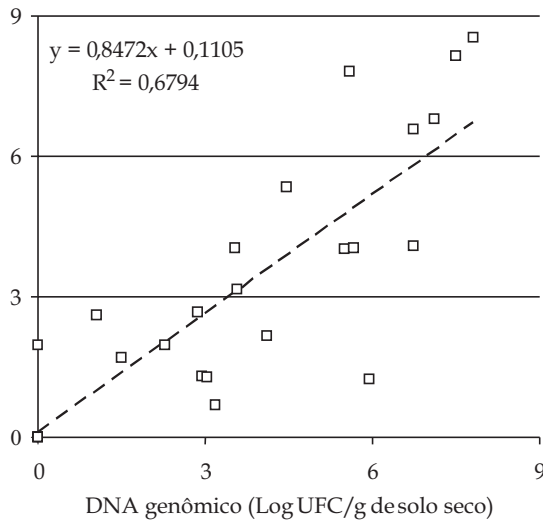
*Trichoderma atroviride* SC1 foi também isolado nas folhas das videiras plantadas nas covas tratadas com o fungo. A quantidade de UFCs de *Trichoderma atroviride* SC1/mm<sup>2</sup> de folha, das plantas que cresceram em solo tratado com o isolado, foi significativamente maior que a quantidade de *Trichoderma* spp. de plantas que cresceram nas covas não tratadas. Verificou-se, ainda, uma diferença significativa no número de UFCs de *Trichoderma atroviride* SC1 nas folhas basais das plantas que cresceram em covas tratadas, quando comparado ao número de UFCs deste fungo quantificado nas folhas apicais das mesmas plantas (Figura 3).

Não foram observadas diferenças significativas entre o número de ramos e de folhas, a altura das plantas e o peso seco das raízes das videiras transplantadas nas covas não tratadas e tratadas com *Trichoderma atroviride* SC1.

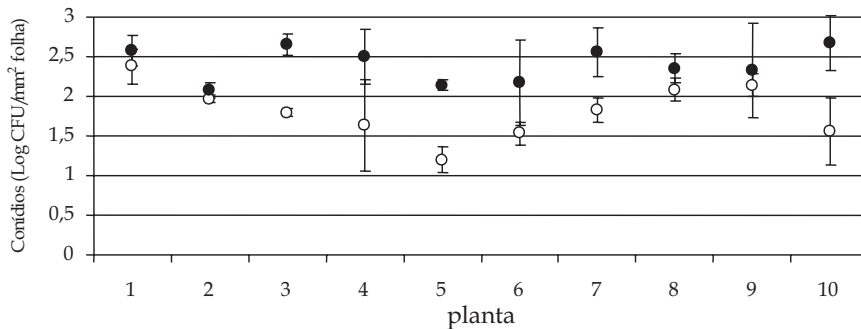




**Figura 1.** Sobrevivência e dispersão vertical de *Trichoderma atroviride* SC1 no solo de um vinhedo do nordeste da Itália, em 2006, utilizando dois métodos de quantificação: diluição em série (●) e “Real-Time PCR” (□). As amostras de solo foram coletadas na superfície e a 10 cm, 20 cm, 30 cm e 40 cm de profundidade, logo após a introdução do antagonista (dia 0) e 1, 5, 9 e 18 semanas após. A temperatura do solo a 10 cm de profundidade (♦) e a precipitação pluviométrica (colunas) estão indicadas na parte superior do gráfico. Os dados de cada ponto se referem às médias de 5 repetições transformadas por log (x + 1). As barras representam a média ± desvio padrão.



**Figura 2.** Correlação da população de *Trichoderma atroviride* SC1 avaliada utilizando UFCs e cópias do DNA genômico (□). O isolado foi introduzido ( $10^8$  UFC/g de solo seco) na superfície do solo em um vinhedo no nordeste da Itália, em 2006. As amostras foram coletadas no dia da introdução do antagonista e 1, 5, 9 e 18 semanas após, na superfície e 10 cm, 20 cm, 30 cm e 40 cm de profundidade. Os resultados são apresentados como unidades formadoras de colônia (UFC) e número de cópias do DNA genômico (CN) por grama de solo seco. Os dados correspondem a média de 5 repetições transformados por log (x+1).



**Figura 3.** Distribuição de *Trichoderma atroviride* SC1 nas folhas basais (●) e apicais (○) de videiras plantadas em solo tratado com antagonista em um vinhedo do nordeste da Itália, em 2006. As folhas foram coletadas nove semanas após a inoculação. Os dados correspondem a média de 3 repetições transformadas por log (x+1). As barras representam a média  $\pm$  desvio padrão.

## Discussão

*Trichoderma atroviride* SC1 persistiu por longo tempo após a sua introdução no solo. Mesmo após um ano o fungo foi detectado em uma concentração de  $10^3$  UFC/g de solo. Este fato indica a sua capacidade de manter uma população estável no solo nas condições ambientais do vinhedo. Este comportamento de fungos do

gênero *Trichoderma* tinha sido observado por Leandro *et al.* (2007), que obteve resultados similares em experimentos realizados com um isolado de *Trichoderma hamatum*, o qual manteve uma população de  $10^3$  UFC/g de solo em condições de campo, até oito meses após a sua introdução com adição de composto orgânico. O reisolamento de *Trichoderma atroviride* SC1, um ano após a sua introdução, indica que este microrganismo é apto a suportar as variações de temperatura e de umidade no solo decorrente da mudança das estações do ano.

A longa e estável persistência do isolado SC1 em condições de campo pode estar relacionada ao fato que o inóculo foi composto do fungo crescendo em arroz e este pode ter garantido uma adequada e acessível fonte de nutriente para o seu crescimento e esporulação. Muitos estudos demonstraram que quando agentes de controle biológico são introduzidos juntamente com uma fonte de nutriente, pode ocorrer um aumento da sua proliferação no solo (Beagle-Ristaino & Papavizas, 1985; Sivan & Chet, 1989).

A longa persistência de *Trichoderma atroviride* SC1 no solo em condições de campo pode ser considerada como um indicador do seu potencial no combate à armilariose em videiras. Como *Armillaria mellea* sobrevive por longo tempo em restos vegetais lenhosos como tocos, galhos ou raízes apodrecidas, a ação direta de um agente de controle biológico contra este patógeno, dependerá da sua capacidade de sobrevivência e, conseqüentemente, da sua permanência no ambiente. O antagonista pode agir por antibiose, prevenindo o desenvolvimento do micélio e rizomorfas; pela limitação do substrato ocupado; pela pré-ocupação do substrato ou pela eliminação do patógeno do substrato ocupado (Hagle & Shaw, 1991).

A migração do isolado SC1 da superfície, onde foi aplicado, para as camadas mais profundas do solo permitiu o estabelecimento do até 40 cm de profundidade. Embora a sua concentração seja mais alta na superfície do que nas camadas mais profundas do solo, este resultado concorda com observações feitas para populações indígenas de *Trichoderma* spp. que estão presentes em alta concentração nos horizontes mais superficiais do solo e decrescem nas camadas mais profundas (Sariah *et al.*, 2005). Esta migração vertical do isolado SC1 no solo é mais um aspecto relevante no que concerne a exposição do patógeno *Armillaria mellea* ao antagonista. Isto porque, as rizomorfas de *Armillaria* emitidas a partir das placas miceliais e que podem constituir a principal forma de expansão deste fungo (Fox, 2000), ocorrem de modo mais amplo e em maior quantidade na camada superficial do solo (0-10 cm), sendo encontradas em menor densidade na camada intermediária (10-20 cm) e raramente abaixo de 30 cm de profundidade (Redfern, 1973). Deste modo, a distribuição vertical do isolado SC1 coincide com a distribuição das rizomorfas de *Armillaria* no solo, as quais estarão mais expostas ao ataque do antagonista. Além disso, o antagonista age invadindo e ocupando o espaço que seria colonizado pelo patógeno, restringindo a sua difusão no solo.

*Trichoderma atroviride* SC1 foi detectado em baixa concentração nos horizontes mais profundos do solo. A 30 e 40 cm de profundidade, a baixa densidade de conídios e a sua irregular distribuição provocaram um aumento do desvio padrão. De fato, o coeficiente de variação associado às maiores profundidades foi superior que aquele observado nas camadas mais superficiais. Estas observações podem ser correlacionadas à alta variabilidade espacial associada a solos intactos (Angle *et al.*, 1995).

A incorporação de uma grande quantidade de conídios na superfície permitiu uniformizar a distribuição no solo superficial, o que reduziu drasticamente a variabilidade espacial nesta camada.

Alguns isolados de *Trichoderma* são hábeis colonizadores e crescem em associação com as raízes das plantas, propriedade denominada competência rizosférica (Ahmad & Baker, 1988a). Esta capacidade foi também demonstrada para o isolado SC1. A concentração de  $1 \times 10^6$  UFC/g de solo na rizosfera das plantas examinadas, após 18 semanas da sua introdução no solo, foi superior ao resultado obtido por McLean *et al.* (2005), utilizando o isolado C52 de *Trichoderma atroviride*.

A capacidade de *Trichoderma atroviride* SC1 de estabelecer-se na rizosfera de videira consiste em mais um aspecto positivo da sua utilização no controle biológico de *Armillaria mellea*. Segundo Hagle & Shaw (1991), os microrganismos antagonistas que podem ser usados para o controle de infecções causadas por *Armillaria* devem ser tanto colonizadores de madeira como competidores da rizosfera. Além disso, um antagonista bem estabelecido na rizosfera poderá impedir a entrada do patógeno e manter a atividade antagonista por um período de tempo longo o suficiente para detê-lo (Raziq, 2000).

A colonização das raízes por *Trichoderma* pode também provocar outros efeitos benéficos no crescimento e na produtividade das plantas (Chang *et al.*, 1986; Ahmad & Baker, 1988b; Lynch *et al.*, 1991). Contudo, nas condições experimentais do presente estudo, *Trichoderma atroviride* SC1 não promoveu o desenvolvimento das plantas.

*Trichoderma atroviride* SC1 foi detectado nas folhas das videiras plantadas em covas nas quais o antagonista tinha sido introduzido. Esta migração do fungo para a parte aérea das plantas foi provavelmente passiva, ou seja, como consequência das partículas de solo dispersas pelas chuvas ou pela ação do vento (Kinkel, 1997). Esta consideração é ratificada pela presença de partículas de solo detectadas na parte abaxial das folhas durante a amostragem. Os resultados também indicaram que, devido à proximidade da fonte de inóculo, as folhas basais estiveram mais expostas e, conseqüentemente, apresentaram maior população do SC1 que as folhas apicais.

*Trichoderma atroviride* SC1 não causou fitotoxicidade, nem foi patogênico à videira. De fato, não se verificou sintoma de doença em nenhuma das plantas após o tratamento do solo, ainda que este tenha sido reisolado nas folhas.

*Trichoderma atroviride* SC1 pode disseminar-se nas áreas circunvizinhas àquela onde foi introduzido, pois foi detectado, na superfície do solo, a 2,0 e 4,0 m de distância da cova, respectivamente após 9 e 18 semanas de sua introdução. A concentração de conídios decresceu com o aumento da distância do ponto de introdução, de modo que uma maior concentração foi encontrada a 2,0 m de distância do que a 4,0 m.

A concentração de conídios decresceu também com o tempo, tendo sido detectada em maior quantidade na 9ª semana do que na 18ª semana, a 2,0 m de distância do ponto de introdução.

Considerando-se que a quantidade de UFCs do isolado SC1 recuperadas no solo após a 18ª semana de sua introdução é equivalente àquela observada para

a população nativa de *Trichoderma* no ambiente, pode-se inferir que *Trichoderma atroviride* SC1 se dispersa no agroecossistema, mas esta dispersão é limitada e a sua propagação não representa um impacto negativo para o vinhedo nas condições ambientes estudadas. Além disso, um ano após a introdução, *Trichoderma atroviride* SC1 foi detectado no solo na mesma concentração e com a mesma frequência observada para a população nativa de *Trichoderma*.

Com base nestes resultados, pode-se concluir que, após a sua introdução no ambiente, este agente de controle biológico torna-se uma parte integrante da microbiota do solo e um componente do ecossistema. De acordo com Brimmer & Bolland (2003), o mais importante impacto ambiental negativo provocado pela utilização de um agente de controle biológico é uma possível redução da biodiversidade e/ou da abundância da comunidade de microrganismos não-alvos do solo. Este pode ser um impacto esperado quando se estuda um microrganismo que se estabelece e persiste por longos períodos de tempo no ambiente onde foi introduzido. Por este motivo, o efeito de *Trichoderma atroviride* SC1 sobre a microbiota do solo é um dos aspectos a ser investigado em trabalhos futuros, de modo a ampliar a compreensão dos efeitos deste agente de biocontrole no ambiente.

## Considerações Finais

Nos últimos anos, na região de Trentino/Itália, verificou-se um incremento da ocorrência de *Armillaria mellea*, agente causal da podridão de raízes em videiras. A presença deste patógeno no solo pode prejudicar a produtividade das plantas adultas e comprometer a implantação de novos vinhedos, devido à sobrevivência do inóculo em restos vegetais, por vários anos e à possibilidade de infecção das plantas jovens. O controle da armilarirose com métodos físicos e químicos é atualmente inadequado ou impraticável. Não existem produtos capazes de erradicar ou controlar a doença. A desinfestação do solo com fumigantes é ineficaz, porque estes não alcançam o patógeno que, em geral, se encontra protegido no interior do córtex da raiz colonizada. Além disso, os fumigantes causam um efeito negativo na microbiota do solo, eliminando os potenciais antagonistas naturais.

O controle biológico, mediante a utilização de microrganismos antagonistas a *Armillaria mellea*, pode constituir uma alternativa em um sistema de controle integrado deste patógeno. Neste caso, o antagonista ideal deverá ser um bom colonizador de partes vegetais e da rizosfera. Deverá, ainda, apresentar outras características como: reproduzir-se adequadamente no solo, colonizar e ocupar o substrato orgânico e competir ou co-existir com outros antagonistas.

No presente estudo, o isolado SC1 de *Trichoderma atroviride*, com processo de patente em desenvolvimento (PCT/IT2008/000196, 21/03/2008), e indicado como eficaz agente no controle de *Armillaria mellea*, permaneceu em alta concentração no solo, durante um longo período de tempo, demonstrando as características adequadas para um potencial agente de

biocontrole deste patógeno. Além disso, nenhum impacto ambiental negativo foi evidenciado na área onde o isolado SC1 foi introduzido e a limitada dispersão do antagonista nas áreas circunvizinhas evidenciou que qualquer efeito decorrente da sua aplicação no agroecossistema, seria restrito à distância de 4,0 m da área onde foi introduzido.

Espera-se que *Trichoderma atroviride* SC1 possa vir a ser comercializado e, em conjunto com as práticas agrícolas e precauções aconselhadas, venha a tornar-se um instrumento eficaz para o controle da armilarirose na cultura da videira.

## Agradecimentos

Esta pesquisa foi desenvolvida no SafeCrop Center, financiada por meio do fundo para a pesquisa da Província Autônoma de Trento (Itália).

## Referências

- Ahmad, J.S. & Baker, R. Rhizosphere competence of benomyl-tolerant mutants of *Trichoderma* spp. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 694-696. 1988a.
- Ahmad, J.S. & Baker, R. Implications of rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Canadian Journal of Microbiology* 34: 229-234. 1988b.
- Angle, J.S.; Levin, M.A.; Galiardi, J. & McIntosh, M.S. Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (*lacZY*) in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 2835-2839. 1995.
- Baumgartner, K. Root collar excavation for postinfection control of *Armillaria* root disease of grapevine. *Plant Disease* 88: 1235-1240. 2004.
- Baumgartner, K. & Warnock, A.E. A soil inoculant inhibits *Armillaria mellea* *in vitro* and improves productivity of grapevines with root disease. *Plant Disease* 90: 439-444. 2006.
- Beagle-Ristaino, J.E. & Papavizas, G.C. Survival and proliferation of propagules of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* in soil and in plant rhizospheres. *Phytopathology* 75: 729-732. 1985.
- Benitez, T.; Rincon, A.M.; Limon, M.C. & Codon, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7: 249-260. 2004.
- Brimner, T.A. & Boland, G.J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture Ecosystems & Environment* 100: 3-16. 2003.
- Brunner, K.; Zeilinger, S.; Ciliento, R.; Woo, S.L.; Lorito, M.; Kubicek, C.P. & Mach, R.L. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 3959-3965. 2005.
- Chang, Y.C.; Baker, R.; Kleifeld, O. & Chet, I. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70: 145-148. 1986.
- Dodd, S.L.; Lieckfeldt, E. & Samuels, G.J. *Hypocrea atroviridis* sp. nov., the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. *Mycologia* 95: 27-40. 2003.
- Elad, Y. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases - control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. *Biocontrol Science and Technology* 10: 499-507. 2000.
- European Parliament, 15 July 1991, Council Directive no. 91/414/EEC. Concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Union*, 19/07/1991, L230: 1-194. 1991.

- Fox, R.T.V. Cultural methods to manage *Armillaria*, In Fox, R.T.V. (Ed.) *Armillaria* Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus. Andover UK. Intercept Press. 2000. pp.151-171.
- Gams, W.; Hoeksstra, E.S. & Aptroot, A. CBS Course of Mycology. Baarn NL. Centraalbureau voor Schimmelcultures. 1998.
- Hagle, S.K. & Shaw, C.G. Avoiding and reducing losses from *Armillaria* root rot Disease. In: Shaw, C.G. & Kile, G.A. (Eds.) *Armillaria* Root Disease. Agriculture Handbook, n. 691. Washington, DC. Forest Service-USDA, 1991. pp. 157-173.
- Harman, G.E. Myths and dogmas of biocontrol: Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393. 2000.
- Howell, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87: 4-10. 2003.
- Kinkel, L.L. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 35: 327-347. 1997.
- Leandro, L.F.S.; Guzman, T.; Ferguson, L.M.; Fernandez, G.E. & Louws, F.J. Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compost-amended soil and on strawberry roots. *Applied Soil Ecology* 35: 237-246. 2007.
- Longa, C.M.O.; Pertot, I. & Tosi, S. Ecophysiological requirements and survival of a *Trichoderma atroviride* isolate with biocontrol potential. *Journal of Basic Microbiology* 48: 269-277. 2008.
- Lu, Z.; Tombolini, R.; Woo, S.; Zeilinger, S.; Lorito, M. & Jansson, J.K. *In vivo* study of *Trichoderma*-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3073-3081. 2004.
- Lynch, J.M.; Wilson, K.L.; Ousley, M.A. & Whipps, J.M. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Letters in Applied Microbiology* 12: 59-61. 1991.
- McLean, K.L.; Swaminathan, J.; Frampton, C.M.; Hunt, J.S.; Ridgway, H.J. & Stewart, A. Effect of formulation on the rhizosphere competence and biocontrol ability of *Trichoderma atroviride* C52. *Plant Pathology* 54: 212-218. 2005.
- Meriles, J.M.; Gil Vargas, S.; Haro, R.J.; March, G.J. & Guzman, C.A. Glyphosate and previous crop residue effect on deleterious soil-borne fungi from a peanut-corn-soybean rotation. *Journal of Phytopathology* 154: 309-316. 2006.
- Paulitz, T.C. & Bélanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133. 2001.
- Pertot, I.; Gobbin, D.; Luca, F. de & Prodorutti, D. Methods of assessing the incidence of *Armillaria* root rot across viticultural areas and the pathogen's genetic diversity and spatial-temporal pattern in northern Italy. *Crop Protection* 27: 1061-1070. 2008.
- Pertot, I.; Longa, C.M.; Prodorutti, D.; Michelon, L. & Savazzini, F. Patent pending: *T. atroviride* SC1 agente di controllo biologico nel patossistema vite/*Armillaria mellea*. Trentino Svilupo/Fondazione Edmund Mach, PCT/IT2008/000196 del 21/03/2008.
- Raziq, F. Biological and integrated control of *Armillaria* root rot. In: Fox, R.T.V. (Ed.) *Armillaria* Root Rot: Biology and Control of Honey Fungus. Andover UK. Intercept Press. 2000. pp. 183-201.
- Raziq, F. & Fox, R.T.V. Cultural techniques for improvement in biocontrol potential of fungal antagonist against armillaria root rot of strawberry plants under glasshouse conditions. *Biological Agriculture & Horticulture* 22: 271-287. 2004.
- Redfern, D.B. Growth and behavior of *Armillaria mellea* rhizomorphs in soil. *Transactions of the British Mycological Society* 61: 569-581. 1973.
- Rifai, M.A. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56. 1969.
- Sariah, M.; Choo, C.W.; Zakaria, H. & Norihan, M.S. Quantification and characterisation of *Trichoderma* spp. from different ecosystems. *Mycopathologia* 159: 113-117. 2005.
- Savazzini, F.; Longa, C.M.O.; Pertot, I. & Gessler, C. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. *Journal of Microbiological Methods* 73: 185-194. 2008.
- Schubert, M.; Fink, S. & Schwarze, F.W.M.R. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against wood decay fungi in urban trees. *Biological Control* 45: 111-123. 2008.

- Shaban, G.M. & El-Komi, H.M.A. Survival and proliferation of alginate encapsulated *Trichoderma* spp. in Egyptian soil in comparison with allyl alcohol soil fumigation. *Mycopathologia* 151: 139-146. 2000.
- Sivan, A. & Chet, I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79: 198-203. 1989.



## Capítulo 12

# Supressividade a Fitopatógenos Habitantes do Solo

Wagner Bettiol<sup>1\*</sup>; Raquel Ghini<sup>1\*</sup>; Rosa R.L. Mariano<sup>2\*</sup>;  
Sami J. Michereff<sup>2\*</sup>; Liliana P. V. Mattos<sup>1</sup>;  
Indira C. M. Alvarado<sup>2</sup> & Zayame V. Pinto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Meio Ambiente, CP 69: 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: bettiol@cnpma.embrapa.br; raquel@cnpma.embrapa.br. <sup>2</sup>UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n 52171-900 Recife, PE, Brasil, e-mail: rmariano@truenet.com.br, sami@depa.ufrpe.br. \*Bolsistas do CNPq.

## Introdução

O fenômeno de alguns solos prevenirem naturalmente o estabelecimento de patógenos ou inibirem as suas atividades patogênicas é denominado supressividade e os solos com essas características, denominados solos supressivos, opostos de solos conducentes. Assim, existem solos que suprimem os patógenos (capacidade do solo para reduzir a densidade de inóculo e suas atividades saprofíticas), enquanto outros suprimem a doença (capacidade do solo reduzir a severidade da doença, mesmo com alta densidade de inóculo e capacidade de sobrevivência do patógeno) (Bettiol & Ghini, 2005). Há relatos de solos supressivos para *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Phytophthora*, *Verticillium*, *Gaeumannomyces* e outros.

O termo solo supressivo foi utilizado pela primeira vez por Menzies, em 1959, em trabalho relacionando tipos de solos com a ocorrência e a severidade da sarna da batatinha, na Califórnia. Entretanto, a primeira referência da capacidade dos solos em controlar doenças das plantas foi de Atkinson, em 1889, ao reconhecer que a murcha de *Fusarium* do algodoeiro foi mais severa em solos arenosos do que nos argilosos em Arkansas e Alabama (Huber & Schneider, 1982).

Ao longo do tempo, relatos correlacionam a incidência de doenças e tipos de solos. Nesses trabalhos, diferentes terminologias foram utilizadas para os solos com essa característica, tais como: resistente, imune, intolerante, competitivo, antagonista, de vida longa, baixo patógeno, fungistático e com poder tampão entre outros (Baker & Cook, 1974; Huber & Schneider, 1982). Mesmo introduzido por Menzies em 1959, o termo solo supressivo foi popularizado somente a partir da década de 70, devido às publicações de Baker & Cook (1974), Hornby (1983, 1990) e Schneider (1982).

Com base na duração, Hornby (1983) dividiu a supressividade em dois tipos: de longo e de curto prazo. Supressividade de curto prazo pode ser resultado de alterações em práticas agrícolas, como fertilização, correção de acidez, cultivo mínimo, monocultura, incorporação de matéria orgânica e introdução de antagonistas, podendo desaparecer rapidamente com novas alterações. A de longo prazo pode ser resultado de propriedades físicas e químicas estáveis do solo, sendo observada por muitos anos, muitas vezes desde o início da exploração do solo (Bettiol & Ghini, 2005).

Os fatores biológicos controlando doenças radiculares são, possivelmente, os mais estudados e conhecidos. As dificuldades de alguns patógenos em se estabelecer no solo e a inibição de sua atividade patogênica são amplamente descritas. Essa capacidade pode ser destruída com o aquecimento do solo e consequente morte dos organismos ou pode ser transmitida por meio da incorporação de uma porção desse solo em outro que ocorre a doença. Os estudos com controle biológico de patógenos habitantes do solo são realizados principalmente com fungos e bactérias, sendo pouco explorado o potencial de outros organismos como protozoários, microartrópodos, nematóides e anélidas, entre outros. Assim, um solo com alta diversidade biológica apresenta maior capacidade de suprimir os patógenos (Bettiol & Ghini, 2005). Segundo Schneider (1982), solos supressivos são comuns em ambientes ecologicamente balanceados de ecossistemas em clímax, nos quais os constituintes físico-químicos e microbianos tiveram anos para estabilizar.

Dentre os organismos envolvidos na supressividade de solos, os fungos são os mais estudados. Isso se deve ao interesse na obtenção de produtos comerciais à base de fungos para o controle biológico de patógenos habitantes do solo. Dentre os fungos, sem dúvida, os mais estudados pertencem ao gênero *Trichoderma*. Há alguns anos, a eficiência desse fungo era discutida, mas sem uso comercial. Entretanto, diversos produtos à base desse antagonista são comercializados atualmente (Bettiol & Morandi, 2008; Fravel, 2008). Além dele, *Coniothyrium minitans*, *Fusarium oxysporum* não patogênico, *Pythium oligandrum*, *Sporidesmium sclerotivorum*, *Gliocladium virens* e *Clonostachys rosea* entre outros, são descritos como agentes de controle biológico de patógenos veiculados pelo solo e comercializados em diferentes regiões (Fravel, 2008; Melo, 1996; Garibaldi *et al.*, 1988a; Alabouvette, 1986; Garibaldi *et al.*, 1988b; Larkin *et al.*, 1996; Toyota *et al.*, 1995; McLaren *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1996; Berry *et al.*, 1993; Gauch & Ribeiro, 1998; Lumsden, 1995; Adams, 1990). Também os fungos formadores de micorrizas, que colonizam as raízes, córtex e a região que envolve a raiz, são importantes na supressividade dos solos (Rodríguez-Kabana & Calvet, 1994). Entretanto, o importante para esse fenômeno não é a ocorrência isolada de um antagonista, mas sim um complexo, pois dessa forma,

vários mecanismos de ação funcionam simultaneamente. Um dos problemas atuais da agricultura é justamente manter a comunidade desses organismos em equilíbrio para que não ocorra a quebra da supressividade.

Dentre as bactérias envolvidas na supressividade dos solos, as dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são as mais estudadas. Além da ação direta nos solos por antibiose e competição, precisa ser considerada a ação das rizobactérias promotoras de crescimento na bioproteção de plantas contra patógenos (Luz, 1996; Melo, 1998; Weller, 1988). Dentro do gênero *Bacillus*, as espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* se destacam quanto à capacidade de inibir tanto bactérias, como fungos fitopatogênicos. As actinobactérias também são importantes no controle de fitopatógenos, sendo a ação devida principalmente à produção de antibióticos. As bactérias envolvidas na supressividade não estão limitadas aos grupos citados, os quais são provavelmente os mais estudados devido à maior ocorrência nos solos.

Diversos organismos também estão relacionados com a supressividade natural dos solos a fitopatógenos, sendo discutidos os efeitos dos colembolos, protozoários e minhocas por Lartey *et al.* (1989), Curl *et al.* (1985), Habte & Alexander (1975); Anderson & Patrick (1980), Chakraborty (1983, 1985), Moody *et al.* (1996) e Szczech *et al.* (1993), entre outros.

Cada organismo apresenta um determinado potencial de controlar naturalmente os patógenos habitantes do solo. Assim, o importante é buscar práticas agrícolas que estimulem a sobrevivência e a multiplicação desses organismos para manter ou tornar o solo supressivo. Os organismos relacionados com a supressividade agem por meio dos mecanismos envolvidos no controle biológico de doenças de plantas, ou seja: antibiose ou amensalismo, parasitismo, competição, predação e indução de resistência do hospedeiro. Apesar dessa divisão, diversos organismos agem por mais de um mecanismo, sendo por isso beneficiados no ambiente em que vivem (Bettiol & Ghini, 2003).

As propriedades físicas e químicas do solo interferem na supressividade de forma indireta, por meio do favorecimento da atividade microbiana ou diretamente, quando interferem no ciclo de vida do patógeno. As principais características físicas e químicas do solo envolvidas na supressividade são: teor de matéria orgânica, pH, macro e micronutrientes, estrutura e textura, tipo de argila, retenção de água e condutividade elétrica, entre outras. Solos ricos em matéria orgânica geralmente apresentam maior supressividade. Esse fato deve-se, principalmente, à capacidade de suportar maior atividade microbiana e melhorar a estrutura do solo, propiciando maior aeração e retenção de umidade. As matérias orgânicas podem ainda servir como fontes de micronutrientes, hormônios, substâncias de sua decomposição, aminoácidos e outras. Esses compostos químicos podem induzir a resistência do hospedeiro ou controlar diretamente o patógeno. Há necessidade de se considerar as características da própria matéria orgânica, pois existem relatos onde houve efeito reduzindo ou aumentando a incidência e/ou severidade e em outras não interferindo na intensidade das doenças (Hoitink & Boehn, 1991; Lazarovits, 2004; Lazarovits *et al.*, 2001, 2005, 2006; Tenuta *et al.*, 2002; Ureba *et al.*, 2005; Abbasi *et al.*, 2006; Yogev *et al.*, 2006; Termorshuizen *et al.*, 2006; Domingues, 2006; Mattos, 2007; Ghini *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2007; Veras *et al.*, 2007; Janvier *et al.*, 2007; Pinto, 2008; Bettiol & Santos, 2008; Abassi *et al.*, 2009).

Höper & Alabouvette (1996) discutem os efeitos do pH do solo sobre doenças causadas por *Streptomyces scabies*, *Phytophthora* spp., *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Plasmodiophora brassicae*, *Verticillium* spp. e *Fusarium solani*. A disponibilidade de nutrientes (macro e micronutrientes) é importante para o controle de doenças, pois além dos aspectos fisiológicos e morfológicos das plantas, também pode alterar o desenvolvimento dos fitopatógenos. A textura e a estrutura do solo interferem no desenvolvimento das plantas, fungos, bactérias, microartrópodos, protozoários e minhocas entre outros organismos. Além disso, interferem, por exemplo, na porosidade que está relacionada com a retenção de umidade e aeração, extremamente importantes para a comunidade de organismos do solo e, conseqüentemente, na supressividade. Bianchini *et al.* (1997), ao discutirem o controle da podridão radicular do feijoeiro causada por *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*, afirmam que a principal medida de controle da doença é minimizar a compactação do solo, devendo ser adotadas práticas culturais que eliminem camadas de compactação e melhorem a estrutura do solo. A mesma recomendação é dada para o controle de outras podridões radiculares causadas por *Fusarium solani* em diversas culturas. Höper *et al.* (1995) verificaram o envolvimento da caolinita, montmorilonita e ilita na supressividade de solo à murcha-de-fusário do linho, pois quando essas argilas foram incorporadas num solo conducente à doença, ocorreram alterações nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e essas modificações aumentaram a supressividade.

A supressividade natural, quando devida a fatores biológicos, pode ser facilmente quebrada pelo uso de pesticidas. Com a aplicação dos pesticidas ocorrem diversas alterações na comunidade de organismos do solo. Entretanto, devido às conseqüências diretas, as primeiras relatadas são as relacionadas com o surgimento de doenças. Os efeitos podem ser pela inibição direta dos antagonistas envolvidos na supressividade, ou pela quebra do equilíbrio existente. No solo, as diferentes interações biológicas mantêm um equilíbrio entre os componentes, sendo que a entrada de um pesticida pode afetar o balanço biológico (Bollen, 1984), o que resulta em interferências no processo natural de supressão de patógenos (Rodrigues-Kabana & Calvet, 1994).

## **Manipulação do Solo para a Indução da Supressividade**

As propriedades físicas, químicas e biológicas do solo estão envolvidas na supressividade, existindo interações entre elas. Assim, alterações em quaisquer dessas propriedades, visando à indução da supressividade, conduzem a alterações nas demais, sendo difícil estabelecer exatamente a maior responsável pela supressividade conseguida.

Baker & Cook (1974) sugerem o desenvolvimento da supressividade por meio de: rotação de culturas, acréscimo de substratos orgânicos que estimulem os antagonistas, alteração do pH para nível que estimule os antagonistas e desfavoreça os patógenos, uso de métodos de cultivo do solo que melhorem a sua estrutura e

favoreçam os antagonistas, épocas adequadas de semeadura para favorecer os antagonistas e o hospedeiro, incorporação de matéria orgânica, introdução massal de antagonistas e manejo adequado da irrigação. Essas sugestões são para estimular os componentes da supressividade. Entretanto, também são sugeridas a transferência de porções de solos supressivos para os solos conducentes (Baker & Chet, 1984), a monocultura para determinados patossistemas, como trigo x *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* (Schneider, 1982) e beterraba açucareira x *Rhizoctonia solani* (Hyakumachi, 1996), bem como a adição de determinados tipos de argilas (Amir & Alabouvette, 1993).

O efeito da incorporação de resíduos orgânicos na indução da supressividade do solo pode ocorrer pelo estímulo da atividade da biota, pelo aumento da comunidade de agentes de biocontrole, pelos compostos liberados durante a decomposição da matéria orgânica ou pela composição do próprio resíduo orgânico. A estratégia de incorporar resíduos orgânicos vem recebendo atenção especial, pois é uma alternativa viável para reduzir o uso de fungicidas na agricultura e para uma adequada disposição dos resíduos. Bettiol & Santos (2008) discutem amplamente os efeitos de lodo de esgoto sobre fitopatógenos habitantes do solo. Lazarovits *et al.* (2005) discutem os modos de ação dos resíduos sobre os patógenos.

## **Efeito de Hidrolisado de Peixe na Severidade da Murcha Causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Raça 3 em Tomateiro**

A murcha-de-fusário, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, é uma das doenças mais importantes do tomateiro, sendo disseminada na maioria dos países onde essa hortaliça é cultivada (Jones, 1991; Kurozawa & Pavan, 1997a). Em mudas, a murcha-de-fusário causa flexão e curvatura, para baixo, das folhas mais velhas, geralmente, seguidas de murcha e morte. Plantas no campo podem ser infectadas em qualquer estágio de desenvolvimento, mas a doença, geralmente, se torna mais evidente quando a planta está iniciando a maturação dos frutos. Os sintomas se iniciam com um amarelecimento das folhas inferiores, que, gradualmente, murcham e morrem. Com o progresso da doença, a folhagem e os ramos se tornam amarelos e murcham. Quando o caule é cortado, observa-se uma coloração marrom intensa na região do xilema, que é um dos sintomas característicos da doença e que ajuda na sua identificação (Barksdale *et al.*, 1972; Elias *et al.*, 1991; Kurozawa & Pavan, 1997a,b).

Os isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, de acordo com sua habilidade de infectar e causar doença em uma série de cultivares diferenciadoras, são agrupados em três raças. As raças 1 e 2 estão distribuídas no mundo todo, enquanto a raça 3 tem sua distribuição geográfica ainda limitada, com relatos na Austrália (Grattidge & O' Brien, 1982), em alguns estados dos Estados Unidos da América (Volin & Jones, 1982; Davis *et al.*, 1988; Jones, 1991), na Nova Zelândia e Reino Unido (Urban, 1994). Na América Latina, até o momento, há relatos desta raça na Venezuela (Laterrot *et al.*, 1988), México (Valenzuela-Ureta *et al.*, 1996) e no Brasil (Reis *et al.*, 2005).

Apesar de limitada geograficamente, a raça 3 representa uma ameaça potencial, podendo se tornar um novo problema para os cultivos de tomate no Brasil, uma vez que o controle do patógeno é realizado, quase que exclusivamente, com a utilização de variedades e híbridos resistentes (Jones, 1991; Kurozawa & Pavan, 1997b; Lopez *et al.*, 2003). E, até o momento, não existem materiais disponíveis com resistência contra essa raça no mercado para cultivo comercial.

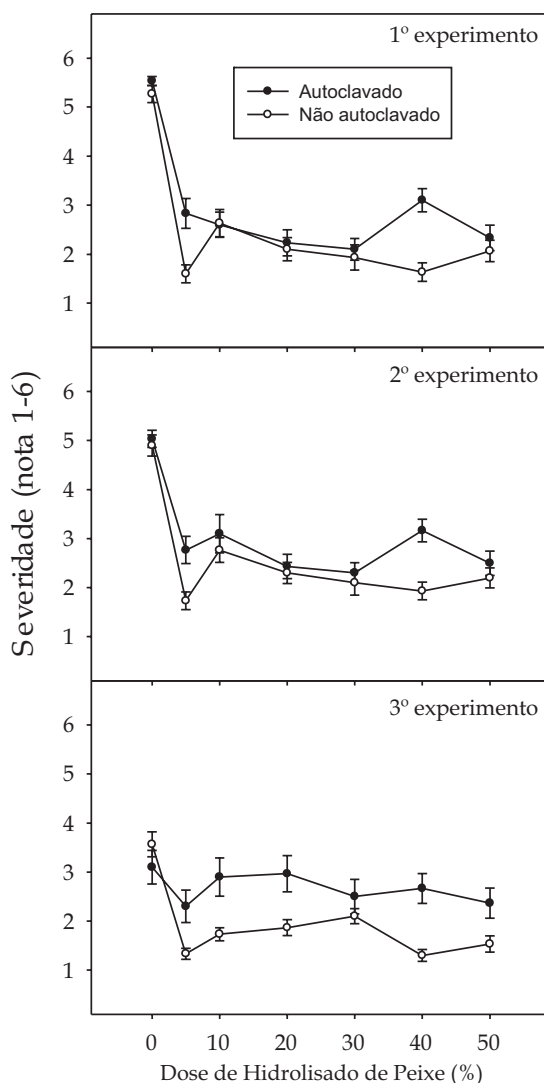
Mattos (2007) e Mattos & Bettiol (2008) estudaram o potencial de um hidrolisado de peixe (fertilizante orgânico obtido pela fermentação de resíduos de peixes marinhos frescos, comercializado com o nome de Fishfertil<sup>®</sup>, por Gerbi Ltda.), em controlar *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) raça 3 em tomateiro. Nos estudos foram utilizados três isolados da raça 3 de *Fol* (145, 146 e 149, fornecidos por Reis, Embrapa Hortaliças). O substrato (40% de substrato à base de casca de pinus compostada e 60% de latossolo), esterilizado e não esterilizado, foi infestado com clamidósporos dos três isolados de *Fusarium*, para obter a concentração de 10<sup>5</sup> UFC/g de substrato. Após 15 dias de incubação, o hidrolisado de peixe, nas concentrações de 0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, do volume de água necessária para atingir a capacidade de campo, foi incorporado ao substrato. Transcorridos 10 dias, uma muda de tomate cultivar Santa Clara (suscetível à raça 3), com 30 dias de idade, foi transferida para cada vaso contendo 3 l de substrato. Além desses tratamentos, foi mantida uma testemunha sem infestação do patógeno. As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação e, após 40 dias, foi avaliada a severidade da doença, por meio de escala de notas, para escurecimento vascular e sintomas externos adaptadas de Tokeshi & Galli (1967) e Santos (1999). Após o primeiro cultivo foram realizados mais dois para avaliar o efeito residual.

Para os três cultivos não foram observadas diferenças na severidade da doença entre os três isolados de *Fol* (145, 146 e 149). Assim, as análises de severidade foram realizadas em conjunto. Em relação às concentrações do hidrolisado de peixe, todas reduziram a severidade da doença (Figura 1). Possivelmente, o principal efeito seja devido à composição do hidrolisado de peixe, rico em ácidos graxos voláteis (Tabela 1). Entretanto, a liberação de amônia e de ácido nitroso e o estímulo das atividades microbianas pela sua incorporação no substrato podem estar envolvidos no controle da doença. Para o substrato esterilizado, a severidade da doença foi sempre superior ao não esterilizado, indicando um estímulo das atividades microbianas neste último.

**Tabela 1.** Concentração de ácidos graxos voláteis (mM) no hidrolisado de peixe (Fishfertil<sup>®</sup>).

Glicolato	768,1
Formato	20,4
Acetato	197,9
Propionato	45,0
<i>n</i> -Butirato	46,4
<i>iso</i> -Butirato	9,0
<i>iso</i> -Valerato	4,6
Total	1091,4

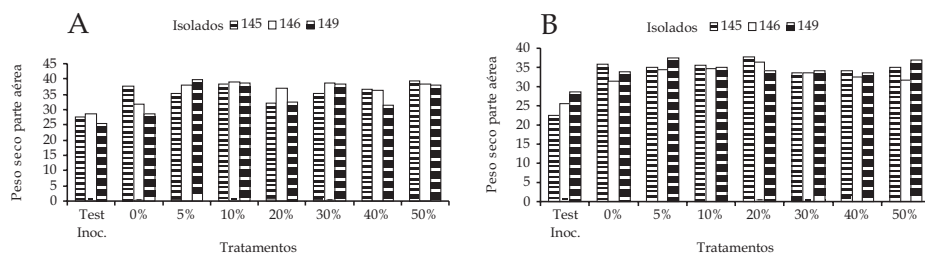
\*Análises realizadas por Lazarovits (comunicação pessoal, 2007).



**Figura 1.** Efeito do hidrolisado de peixe (Fishfertil®) sobre a severidade da murcha-de-fusário causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, em tomateiro. Os valores estão expressos em função das notas, em três escalas diferentes, variando de 1 a 6.

O crescimento das plantas na testemunha infestada com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* foi significativamente inferior à testemunha absoluta e a todos os tratamentos que receberam o hidrolisado de peixe, independentemente dos isolados (Figura 2).

Conclui-se que a incorporação, ao solo, do hidrolisado de peixe, nas concentrações 5% a 50% do volume de água necessário para atingir a capacidade de campo, controla a murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomateiro. No capítulo quatro deste livro, Lazarovits e colaboradores discutem amplamente os mecanismos de ação da emulsão de peixe no controle de fitopatógenos habitantes do solo.



**Figura 2.** Massa seca da parte aérea das plantas de tomate cultivadas em casa de vegetação após tratamento com hidrolizado de peixe (Fishfertil®) em substrato, esterilizado (A) e não esterilizado (B), infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3

## Caracterização de Solos de Pernambuco quanto à Supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Jones) Hauben *et al.* *lycopersici* causa podridão-mole em ampla gama de plantas hospedeiras em todo o mundo (Pérombelon & Kelman, 1980). Em levantamentos realizados no estado de Pernambuco em 2004, a podridão-mole teve prevalência de 100% em cultivos de couve-chinesa e de 45,2% de alface, evidenciando a importância da doença para essas olerícolas (Silva *et al.*, 2007). O controle da podridão-mole é difícil, uma vez que o patógeno sobrevive em restos culturais infectados, na rizosfera de plantas cultivadas ou invasoras, na água, no solo, como epífita na filosfera de plantas hospedeiras ou invasoras e em insetos (Kikumoto, 1980; Pérombelon & Kelman, 1980). As características do solo, juntamente com os fatores ambientais, podem influenciar na população de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, acelerando ou retardando o desenvolvimento da doença (Pérombelon & Kelman, 1980).

Alvarado *et al.* (2007) caracterizaram solos de Pernambuco com relação à supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Vinte e quatro amostras de solo (Tabela 2), previamente submetidas a análises microbiológicas, físicas e químicas, foram colocadas em caixas tipo Gerbox® (200 g de solo/caixa) e a cada caixa foram adicionados 50 ml de suspensão bacteriana do isolado de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Pcc127<sup>Rif</sup> (mutante espontâneo de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* resistente a 100 ppm de rifampicina) com concentração de  $1 \times 10^9$  UFC/ml homogeneizando-se com bastão de vidro e incubando-se em B.O.D. a  $25 \pm 2$  °C. Os dados populacionais de Pcc127<sup>Rif</sup> analisados semanalmente foram utilizados para o cálculo da taxa de extinção relativa da população (TERP =  $-(\log Y_f - \log Y_0) / (T_f - T_0)$ ), onde  $Y_0$  é a população aos sete dias após a infestação do solo,  $Y_f$  a população na última avaliação antes de zera,  $T_f$  o tempo (em dias) da última avaliação sem zera e  $T_0$  o tempo da primeira avaliação (dia = 7) (Kocks *et al.*, 1998). Para caracterizar os possíveis fatores envolvidos na supressividade ou condução dos solos ao Pcc127<sup>Rif</sup>, foram efetuadas comparações dos valores médios da taxa de extinção relativa da população com as demais variáveis avaliadas em cada solo, pela análise de correlação de Pearson, ao nível de 5% de probabilidade.



As taxas de extinção relativa da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* nos solos de Pernambuco variaram de 0,0547 log (UFC)/dia a 0,6327 log (UFC)/dia, sendo formados seis diferentes grupos de solos pelo teste de agrupamento de Scott-Knott ( $P=0,05$ ) (Tabela 2). A diferença na taxa de extinção relativa da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* em vários solos, com a mesma densidade inicial de inóculo, indica a variabilidade do potencial de inóculo em diferentes tipos de solo. Entende-se como potencial de inóculo a energia de crescimento do organismo patogênico que está disponível para a infecção do hospedeiro, resultante da densidade de inóculo ou número de propágulos, da energia exógena e endógena dos propágulos por unidade, da virulência dos propágulos e dos fatores ambientais, bióticos e abióticos, determinantes da atividade do inóculo. Essa variabilidade existente entre os solos permite segundo Huber & Schneider (1982), classificá-los em supressivos ou conducentes. Nesse contexto, os solos CF-1, SA-1, BG-1, CO-1, GR-1 e GR-2 foram supressivos a *Pcc127<sup>Rif</sup>*, enquanto IG-1, CO-2, CF-7, CF-8 e CF-9 evidenciaram a conduência. A maioria dos solos apresentou comportamento intermediário em relação a esses extremos (Tabela 2).

A formação dos grupos de solos baseada na taxa de extinção relativa da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* não apresentou relação com os locais (municípios) de coleta das amostras, tipos de coberturas na época da coleta ou classes texturais dos solos. A ausência de associação entre histórico de cultivo e populações do *Pcc127<sup>Rif</sup>* foi previamente relatada por Pérombelon & Hyman (1989), baseado em estudo realizado na Escócia no período de 1981 a 1983, envolvendo três campos previamente cultivados com batata. Na maioria das vezes é impossível estabelecer uma relação entre o nível populacional de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo e o início da podridão-mole em couve-chinesa, tendo em vista a grande influência da presença de ferimentos no pecíolo do hospedeiro, bem como da umidade e da temperatura do solo (Togashi & Sakamoto, 1966). Em geral, a bactéria existe no solo em baixos níveis populacionais, menos que  $10^2$  UFC/g solo, mas se multiplica rapidamente no solo em contato com o pecíolo ou solo rizosférico do hospedeiro (Togashi, 1972; Mew *et al.*, 1976). Portanto, como *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* possui um tempo de geração curto, uma pequena quantidade de inóculo primário sobrevivente no solo pode produzir rapidamente uma epidemia na presença de condições favoráveis (Schuster & Coyne, 1974).

Na análise dos possíveis indicadores da supressividade ou conduência dos solos à população de *Pcc127<sup>Rif</sup>*, não foram constatadas correlações significativas ( $P=0,05$ ) entre a taxa de extinção relativa da população e as características químicas, físicas e microbiológicas quando todos os solos foram considerados (Tabela 3). Esse resultado indica que não é possível destacar uma ou um conjunto de características responsáveis pela supressividade ou conduência em todos os solos. Portanto, os fatores responsáveis pela supressividade em determinado solo podem não exercer o mesmo papel em outros, confirmando as observações de Arshad & Martin (2002) sobre a complexidade das interações entre as diferentes propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, o que torna difícil a identificação de indicadores de supressividade do solo que possam ser utilizados em diferentes situações, e reflete, segundo Höper & Alabouvette (1996), na dificuldade frequentemente encontrada para distinção entre fatores primários e secundários responsáveis pela supressividade a doenças e/ou patógenos.

Quando considerados somente os seis solos mais supressivos, a taxa de extinção relativa da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* se correlacionou significativamente ( $P < 0,05$ ) com a densidade aparente do solo ( $r = 0,76$ ), com as populações de bactérias totais ( $r = 0,82$ ) e *Bacillus* sp. ( $r = 0,80$ ). A população de *Bacillus* sp. se correlacionou com a densidade aparente ( $r = 0,96$ ), mas não com a comunidade de bactérias totais ( $r = 0,71$ ), o que pode ser consequência da utilização do mesmo método (plaqueamento em BDA e incubação a  $25 \pm 2$  °C sob alternância luminosa, durante 48 h) para a quantificação das duas populações. Vieira & Nahas (2000) observaram que as maiores contagens de bactérias totais e de *Bacillus* sp. provenientes de solos foram obtidas em diferentes meios de cultura, temperaturas e períodos de incubação. Essa maior comunidade não significa necessariamente maior ou menor número de *Bacillus* sp., pois existem várias populações de outros microrganismos que podem impedir uma correlação. Nahas *et al.* (1997) estudando a atividade microbiana em solo após aplicação de gesso agrícola também não observaram correlação entre aumento de número de bactérias totais e de *Bacillus* sp. Nos cinco solos mais conducentes, houve correlação negativa entre a taxa de extinção relativa da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* e a população de *Bacillus* sp. ( $r = -0,86$ ) (Tabela 3). Por outro lado, as características químicas do solo não se correlacionaram com a taxa de extinção relativa da população nas diferentes combinações de solos (Tabela 3).

A densidade populacional e a sobrevivência de microrganismos no solo dependem de vários fatores, destacando-se a capacidade de produzir estruturas de sobrevivência, os fatores que controlam ou afetam a produção destas estruturas, as condições que afetam a sobrevivência, a diversidade fisiológica, a eficiência na utilização de substratos, os números de hospedeiros principais e alternativos, a competitividade e capacidade de saprofitismo, as estratégias de sobrevivência e a suscetibilidade à microbiostase e antibióticos presentes no solo (Siqueira & Franco, 1988).

A disponibilidade de nutrientes e os níveis de pH no solo parecem não ter afetado as populações do *Pcc127<sup>Rif</sup>* nesse estudo. No entanto, já foi constatado que valores elevados de pH, P, Ca e Mg propiciam aumentos significativos nos níveis populacionais desta bactéria no solo (Kikumoto, 1980; Pérombelon & Hyman, 1989; Armon *et al.*, 1995). Por outro lado, a podridão-mole em couve-chinesa foi eficientemente controlada em campo pela fertilização do solo com hidróxido de cálcio (Kim & Yeoung, 2004).

A importância das propriedades físicas do solo na supressividade de fungos fitopatogênicos habitantes desse ambiente foi destacada por Höper & Alabouvette (1996). A densidade aparente do solo é determinada pela quantidade de espaços porosos e sólidos, sendo que solos com elevada proporção de espaços porosos em relação aos sólidos têm densidades menores do que outros mais compactos e com menos espaços porosos (Brady, 1989). Como o nível de porosidade pode exercer efeito seletivo sobre a capacidade de colonização por determinados microrganismos (Siqueira & Franco, 1988), a correlação positiva entre densidade aparente do solo e taxa de extinção relativa da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* pode ser consequência do nível de porosidade, uma vez que as populações de bactérias são geralmente desfavorecidas pela reduzida porosidade do solo e, conseqüentemente, elevada densidade aparente.

Os solos constituem um sistema dinâmico, onde complexas interações entre as propriedades físicas, químicas e biológicas, se integram continuamente, influenciando e diversificando a microbiota (Siqueira & Franco, 1988). A elevada correlação observada entre supressividade do solo ao *Pcc127<sup>Rif</sup>* e as populações de bactérias totais era esperada, pois as populações de pectobactérias declinam muito rapidamente em solos, no campo, dependendo da sua população bacteriana, além de outros fatores (Mew *et al.*, 1976; Pérombelon & Kelman, 1980). A redução da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* no solo pode ser atribuída à competição com bactérias nativas que utilizam os nutrientes mais eficientemente, a exemplo do constatado por Armon *et al.* (1995), mas o mecanismo de antibiose também pode estar envolvido, pois Kikumoto (2000) destacou que a diferença na habilidade de isolados desta bactéria sobreviverem no solo estava relacionada à sensibilidade a bacteriocinas. Este autor demonstrou o potencial do controle biológico da podridão-mole em couve-chinesa baseado na utilização de isolados avirulentos de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* produtores de bacteriocinas, entretanto nenhum método efetivo de controle foi estabelecido.

Os gêneros de bactérias mais comumente encontrados nos solos com capacidade antagonística a fitopatógenos são *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. (Weller *et al.*, 2002; Bettiol & Ghini, 2005). Nesse estudo, as populações de *Pseudomonas* fluorescentes não se correlacionaram com a taxa de extinção relativa da população do *Pcc127<sup>Rif</sup>* em nenhuma das situações analisadas, embora Mew *et al.* (1976) tenham observado que a presença de *Pseudomonas* fluorescentes no solo influenciou significativamente na redução da severidade da podridão-mole em couve-chinesa. Por outro lado, a influência das populações de *Bacillus* sp. na supressividade ao *Pcc127<sup>Rif</sup>* verificada no presente estudo constitui um aspecto relevante, pois segundo Mazzola (2004), a implementação efetiva de estratégias de manejo ou estímulo à comunidade microbiana antagonista do solo para a supressão de fitopatógenos habitantes desse ambiente requer inicialmente a identificação dos componentes biológicos envolvidos na supressividade e depois o monitoramento do impacto das práticas de manejo na abundância e atividade dessa população microbiana benéfica.

A influência de bactérias formadoras de endosporos na sobrevivência de *Pectobacterium carotovorum* foi estudada por Kikumoto (1980), que verificou o decréscimo rápido na população do patógeno com o aumento das populações de bactérias formadoras de endosporos. Espécies de *Bacillus*, incluindo *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* têm se destacado como importantes agentes de biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo (Emmert & Handelsman, 1999). Essas bactérias são produtoras de antibióticos, além de enzimas que degradam moléculas envolvidas no sinal de “quorum sensing” de muitas bactérias (Garbeva *et al.*, 2004), a exemplo de *Bacillus thuringiensis* no biocontrole de *Pectobacterium carotovorum* (Dong *et al.*, 2004). Mesmo considerando todos esses aspectos, um entendimento completo dos fatores biológicos responsáveis pela supressividade de um solo a um determinado patógeno ou doença requer um conhecimento aprofundado da identidade, frequência relativa e atividade biológica das diversas populações microbianas que habitam a rizosfera. Além disso, o balanço microbiano e a eficiência de um antagonista são dependentes das características físico-químicas do solo, sendo difícil separar os fatores envolvidos na supressividade (Weller *et al.*, 2002), o que ficou evidente no presente estudo com a constatação de correlação significativa entre a população de *Bacillus* sp. e a densidade aparente do solo.

Um aspecto a ser considerado na dificuldade da caracterização dos possíveis mecanismos envolvidos na supressividade dos solos de Pernambuco à população do *Pcc127*<sup>Rif</sup> é a metodologia, uma vez que foram utilizados indicadores tradicionais de supressividade (Hornby, 1983; Chellemi & Porter, 2001). De acordo com Van Bruggen & Semenov (1999), os resultados obtidos utilizando indicadores tradicionais são difíceis de interpretar, motivo pelo qual sugeriram um procedimento alternativo, baseado na mensuração de respostas biológicas a distúrbios ou estresse, assumindo que um solo sadio é estável, com resistência ao estresse. A resposta ao estresse em termos de amplitude e resistência da comunidade microbiana poderia ser um indicador universal para supressão à doença melhor que qualquer outro fator físico, químico ou biológico mensurado somente uma vez a longos intervalos de tempo.

**Tabela 2.** Influência de solos do estado de Pernambuco na taxa de extinção relativa da população (TERP) de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*

Código do solo	Local (município)	Cobertura <sup>(1)</sup>	Textura	TERP <sup>2</sup>
CF-1	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco arenoso	0,6327 a <sup>3</sup>
SA-1	Sairé	milho	Franco argilo arenoso	0,5439 b
BG-1	Barra de Guabiraba	sem plantio	Franco argilo arenoso	0,4011 c
CO-1	Condado	cana-de-açúcar	Argila	0,3682 c
GR-1	Gravatá	couve-chinesa	Franco arenoso	0,3357 c
GR-2	Gravatá	pimentão	Franco arenoso	0,3145 c
CF-2	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,2801 d
AL-1	Abreu e Lima	cana-de-açúcar	Areia franca	0,2315 d
CG-1	Chã Grande	brócoli	Franco arenoso	0,2301 d
CF-3	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,2004 d
BO-1	Bonito	mata	Argila	0,2003 d
SJ-1	São Joaquim do Monte	pimentão	Franco argilo arenoso	0,1992 d
CF-4	Camocim de São Félix	pimentão	Franco argilo arenoso	0,1722 d
SJ-2	São Joaquim do Monte	pimentão	Franco arenoso	0,1667 d
CG-2	Chã Grande	pimentão	Franco arenoso	0,1519 e
CF-5	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,1483 e
GR-3	Gravatá	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,1397 e
CF-6	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,1238 e
AN-1	Aliança	cana-de-açúcar	Franco arenoso	0,1121 e
IG-1	Igarassu	inhame	Franco arenoso	0,0914 f
CO-2	Condado	cana-de-açúcar	Franco arenoso	0,0806 f
CF-7	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco argilo arenoso	0,0799 f
CF-8	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco arenoso	0,0718 f
CF-9	Camocim de São Félix	couve-chinesa	Franco arenoso	0,0547 f
C.V. (%)				10,34

<sup>(1)</sup>Tipo de cobertura do solo na época da coleta. <sup>(2)</sup>Taxa de extinção relativa da população de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* no solo [log UFC/dia], calculada conforme Kocks *et al.* (1998). <sup>(3)</sup>Média de quatro repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Scott-Knott P=0,05).

**Tabela 3.** Correlações entre taxa de extinção relativa da população de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (TERP) e variáveis físicas, químicas e microbiológicas dos solos de Pernambuco, considerando todos os solos analisados (geral) e somente os classificados como supressivo ou conducentes.

Variáveis <sup>1</sup>	Coeficiente de correlação <sup>(1)</sup>		
	Geral	Supressivos	Conducente
Areia (Ar)	-0,29	-0,03	-0,26
Argila (Ar)	0,14	-0,05	-0,07
Silte (Si)	0,46	0,14	0,74
Reação Silte/Argila (Si/Ar)	0,20	0,14	0,56
Densidade aparente (DA)	0,08	0,76*	0,50
Densidade de partículas (DP)	0,05	0,68	-0,40
pH (H <sub>2</sub> O)	-0,06	-0,23	0,65
Potássio (K)	0,02	-0,08	0,58
Sódio (Na)	0,12	0,47	-0,05
Cálcio (Ca)	0,01	-0,01	0,39
Cálcio + Magnésio (Ca+Mg)	0,11	-0,06	0,52
Alumínio (Al)	0,20	-0,25	-0,10
Carbono orgânico (CO)	-0,02	-0,03	0,65
Acidez potencial (H+Al)	0,04	0,35	-0,31
Soma de bases (SB)	0,11	-0,05	0,54
Saturação de bases (v)	0,06	-0,17	0,43
Saturação por alumínio (m)	0,16	-0,24	-0,08
Relação Ca/Mg (Ca/Mg)	-0,10	0,09	-0,40
Relação Ca/K (Ca/K)	0,10	-0,15	-0,20
Bactérias totais (BT)	0,07	0,82*	0,35
<i>Pseudomonas</i> fluorescentes (PF)	-0,09	-0,02	0,58
<i>Bacillus</i> sp. (BC)	0,03	0,80*	-0,86*
Fungos totais (FT)	0,26	-0,16	0,17

<sup>(1)</sup>Coeficientes de correlação de Pearson seguidos por asterisco são significativos a P<0,05.

## Indução de Supressividade à Murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysantemi* pela Incorporação de Matéria Orgânica

Entre os fitopatógenos que podem afetar o cultivo do crisântemo, destaca-se o *Fusarium oxysporum*, agente causal da murcha, que tem importância para a cultura por acarretar elevadas perdas. As medidas de controle preventivas são as mais recomendadas, como: drenagem e limpeza do terreno, eliminação de plantas doentes, mudas sadias, plantio em áreas com baixa densidade do patógeno, uso de antagonistas e substrato supressivo entre outras. Dentre essas medidas, destaca-se a obtenção de substrato supressivo, o qual é capaz de prevenir naturalmente o estabelecimento de fitopatógenos ou inibir suas atividades patogênicas.

Para obter substrato supressivo à murcha de *Fusarium oxysporum* em crisântemo tipo Bola-belga foram utilizados resíduos da agropecuária e urbano-industrial (cama aviária, esterco suíno, torta de mamona e lodo de esgoto) incorporados a substratos comerciais. (Pinto, 2008).

Os estudos foram conduzidos em propriedade que apresentava sérios problemas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysantemi*, utilizando as cultivares de crisântemo (*Crysanthemum morifolium*) Pápirus White, Yellow Marino e Vera Dark. A infestação foi de forma natural por meio do sistema de irrigação por gotejamento. A produção de crisântemo foi realizada por meio do plantio de mudas, formadas por enraizamento de estaca, em vasos plásticos contendo 3,3 l dos substratos testados. Na primeira semana após o plantio das mudas, a irrigação foi realizada com água e nas dezessete semanas seguintes com adição da solução nutritiva (nitrato de cálcio 500g/1000 l; kristasol 5-30-15 600g/1000 l; sulfato de potássio 600g/1000 l; sulfato de magnésio: 250g/1000 l e nitrato de amônio 250g/1000 l). Durante as 10 primeiras semanas, as plantas foram mantidas em ambiente com regime de luz com mais de 15 h/dia para estimular o crescimento vegetativo (fase vegetativa). Depois, as plantas foram transferidas para ambiente com fotoperíodo menor que 12 h/dia para induzir o florescimento (fase generativa).

O substrato comercial utilizado foi o Multiplant® à base de casca de *Pinus* (pH 5,5; EC 0,6µS) e as matérias orgânicas testadas para a indução de supressividade de substrato a *Fusarium* em crisântemo foram: lodo de esgoto da estação de tratamento de esgoto de Jundiá/SP; torta de mamona; esterco de suíno e cama aviária de poedeira criado em sistema orgânico (Tabela 4). As fontes de matéria orgânica foram incorporadas ao substrato comercial nas concentrações de 0, 10, 20 e 30%, bem como em mistura das mesmas, com auxílio de betoneira. Após dez dias de incubação os substratos foram colocados nos vasos para plantio das mudas de crisântemo.

O potencial de supressão dos substratos foi analisado pela severidade da murcha causada por *Fusarium*. A severidade foi avaliada por meio de uma escala de notas proposta por Pinto & Bettioli (2006), sendo 0 = planta sadia, 1 = planta com os vasos da haste central levemente escurecidos, 2 = planta com os vasos da haste central totalmente escurecidos, 3 = planta com os vasos da haste central totalmente escurecidos e pelo menos uma das hastes secundárias com vasos escurecidos, 4 = planta com sintoma de murcha e com todos os vasos escurecidos e 5 = planta morta. A confirmação da presença do fungo nas plantas foi realizada pelo plaqueamento de fragmentos das hastes em meio de Komada (Komada, 1975), para posterior observação das estruturas do fungo em microscópio óptico. As avaliações de severidade foram destrutivas e realizadas após 8, 12, 15 e 20 semanas do transplantio, sendo avaliados cinco vasos de cada tratamento por época.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado com 20 repetições. Os resultados de severidade obtidos nas quatro datas de avaliação foram transformados em área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) para análise.

O lodo de esgoto e a cama aviária controlaram a murcha de *Fusarium* quando incorporadas ao substrato nas concentrações de 10, 20 e 30% (v/v) nas três variedades estudadas. Entretanto, apenas o lodo de esgoto promoveu controle superior a 84%. É importante salientar que todas as plantas produzidas com lodo de esgoto e cama

aviária obtiveram padrão para a comercialização. A torta de mamona e o esterco suíno não controlaram a doença. Além disso, a torta de mamona provocou a morte das plantas nas concentrações de 20 e 30%, por fitotoxicidade (Tabela 5 e Figura 3).

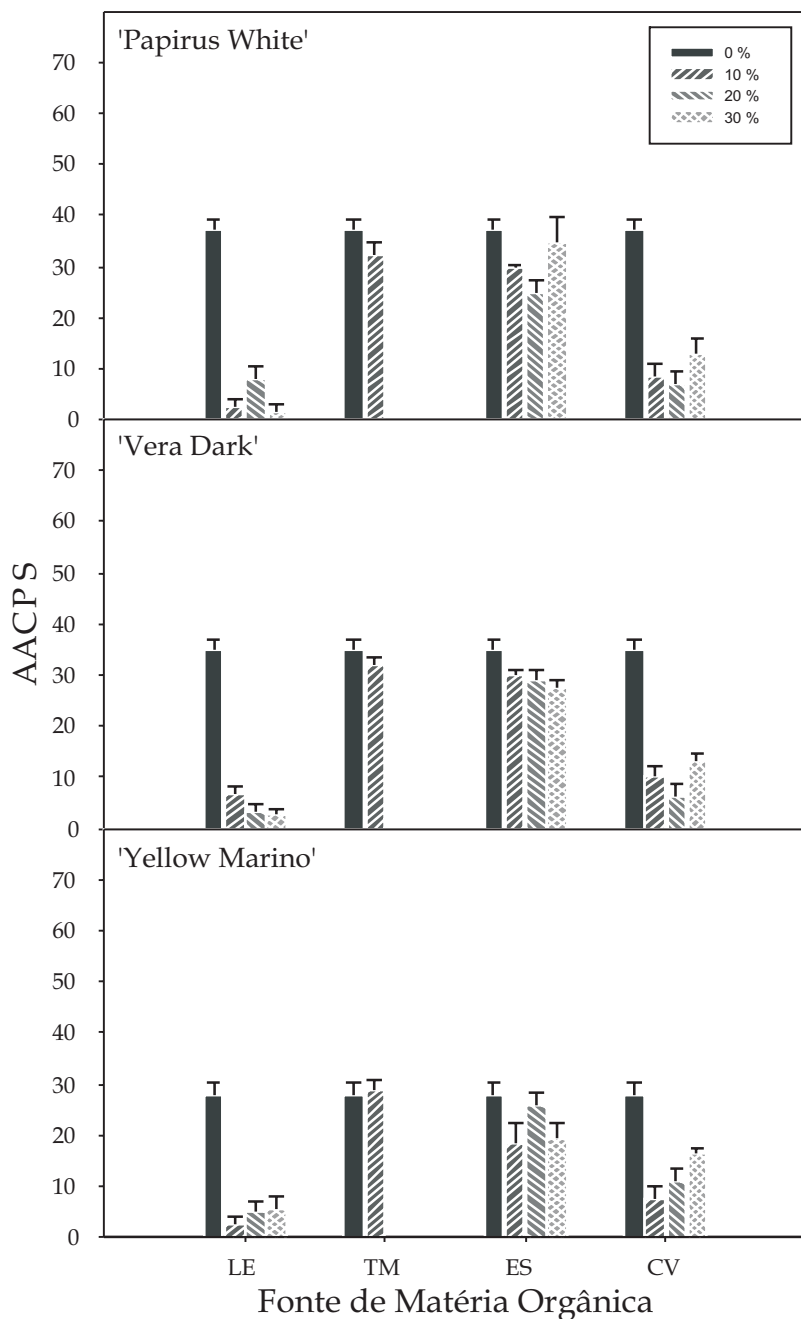
Quando avaliadas as misturas de lodo de esgoto, cama aviária, esterco de suíno e torta de mamona em diferentes combinações nas três cultivares de crisântemo (Papyrus White, Yellow Marino e Vera Dark), a combinação de 15% de lodo de esgoto com 15% de cama aviária reduziu significativamente a área abaixo da curva do progresso da severidade, diferindo dos demais tratamentos (Figura 4), seguido das combinações de lodo de esgoto, torta de mamona e esterco suíno e lodo de esgoto, cama aviária e torta de mamona na proporção de 10% de cada matéria orgânica (Figura 4).

Os resultados estão de acordo com a literatura, na qual há vários relatos de matérias orgânicas controlando doenças em plantas em diferentes patossistemas por meio de solo/substrato supressivo (Abassi *et al.*, 2004; Boehm & Hoitink, 1992; Chef *et al.*, 1983; Conn & Lazarovits, 1999; Fenille & Souza, 1999; Ghini *et al.*, 2007; Lazarovits *et al.*, 2005; Termorhizen *et al.*, 2006; Ureba *et al.*, 2000). No patossistema *Fusarium*-crisântemo há relato da indução de supressividade por composto de casca de madeira (Chef *et al.*, 1983). A indução da supressividade observada nos substratos à base de casca de *Pinus* pela introdução de lodo de esgoto e cama aviária não deve estar relacionada apenas a uma característica alterada no substrato. Esse aspecto fica evidente quando se observa que esses materiais alteram a atividade microbiana, a concentração de nutrientes, o pH e a condutividade elétrica dos substratos (Pinto, 2008).

**Tabela 4.** Atributos do esterco de suíno, cama aviária, lodo de esgoto e torta de mamona utilizados nos ensaios para indução de supressividade de substrato à murcha de *Fusarium* em crisântemo.

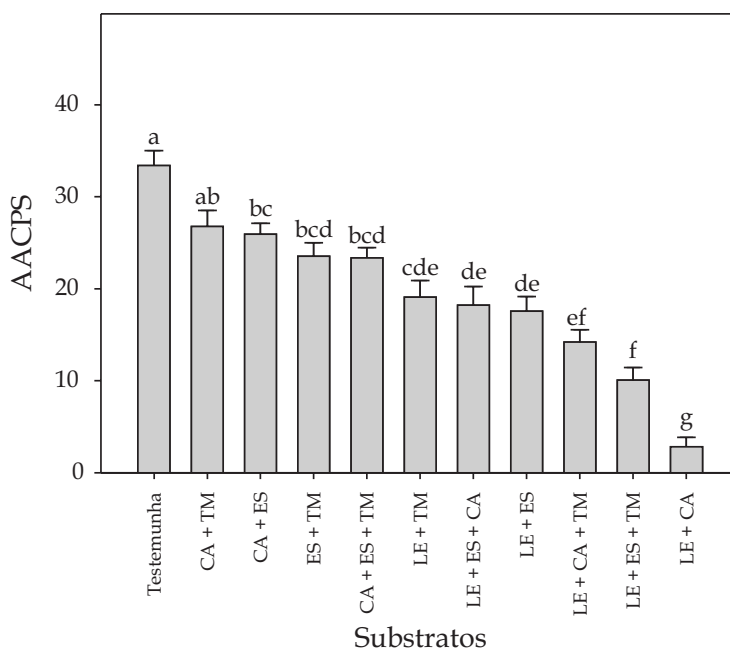
Atributo	Esterco de suíno	Cama aviária	Lodo de esgoto	Torta de mamona
pH	7,5	8,2	4,5	6,5
N g/kg	16,9	36,9	26,2	50
P g/kg	31,7	12,9	10,7	-
K g/kg	6,9	20,2	1,7	-
Ca g/kg	42,8	30,0	2,3	-
Mg g/kg	12,5	4,5	0,9	-
S g/kg	2,3	4,5	6,4	-
C g/kg	137,7	384,0	264,6	350
Fe g/kg	11,5	1,9	45,4	-
B mg/kg	17,6	49,0	58,0	-
Cu mg/kg	229,2	56,7	1058,0	-
Mn mg/kg	1167,0	422,7	82,4	-
Zn mg/kg	932,5	375,8	123,4	-
Umidade %	20,1	15,2	14,6	10
Relação C/N	8,1	10,4	10,1	-

Método de extração: 1:1,5 (Holanda). Métodos de determinação: N-(amoniaco e nitrato): destilação; K, Ca, Mg, P, S, Cu, Fe, Mn, Zn: ICP-OES. Resultados para os teores totais de Carbono e Nitrogênio foram feitos pelo equipamento de análise elementar de CNS (marca ELEMENTAR CNS).



**Figura 3.** Efeito da incorporação de lodo de esgoto (LE), torta de mamona (TM), esterco de suíno (ES) e cama aviária (CV) em substrato à base de casca de Pinus no controle de *Fusarium* nas variedades Papyrus White, Vera Dark e Yellow Marino de crisântemo avaliado pela área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS). As barras são valores médios, acompanhadas de seu erro padrão. Torta de mamona nas concentrações de 20 e 30% matou as plantas por fitotoxicidade.





**Figura 4.** Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) da murcha de *Fusarium* em crisântemo Bola-belga em vasos contendo 70% de substrato à base de casca de *Pinus* (CP) com combinação de 10% (três a três) ou 15% (dois a dois) de lodo de esgoto (LE), cama aviária (CA), esterco suíno (ES) e torta de mamona (TM). As barras são valores médios acompanhados de seu erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey,  $P=0,05$ ;  $R^2=0,67$  e  $CV=29,9\%$ ).

## Considerações Finais

A supressividade de solos ou de substratos é a forma mais adequada de se realizar o controle de fitopatógenos habitantes do solo. Os três casos apresentados e discutidos anteriormente (Efeito de Hidrolisado de Peixe na Severidade da Murcha Causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *Iycopersici* Raça 3 em Tomateiro; Caracterização de Solos de Pernambuco quanto à Supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* e Indução de Supressividade à Murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *chrysantemi* pela Incorporação de Matéria Orgânica) indicam a viabilidade do uso da supressividade. Entretanto, há necessidade de uma busca constante de matérias orgânicas para a produção de substratos supressivos, sendo sugerido o uso de materiais regionalizados para redução de custos. Em relação aos solos seria interessante avaliar a supressividade a diferentes patógenos com a finalidade de auxiliar na escolha da cultura a ser implantada na área.

## Referências

- Abbasi, P.A.; Conn, K.L. & Lazarovits, G. Suppression of *Rhizoctonia* and *Pythium* damping-off of and cucumber seedlings by additions of hydrolyzed to peat mix or soil. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 177-187. 2004.
- Abbasi, P.A.; Conn, K.L. & Lazarovits, G. Effect of fish emulsion used as a pre-plant soil amendment on verticillium wilt, common scab, and tuber yield of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology* 28: 509-518. 2006.
- Abbasi, P. A.; Lazarovits, G. & Jabaji-Hare, S. Detection of high amounts of organic acids in fish emulsion and their role in pathogen or disease suppression. *Phytopathology* 99: 274-281. 2009.
- Adams, P.B. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 28: 59-72. 1990.
- Alabouvette, C. Fusarium-wilt suppressive soils from Chateaufort region: review of 10 years of study. *Agronomie* 6: 273-284. 1986.
- Alvarado, I.C.M.; Michereff, S.J.; Mariano, R.L.R.; Silva, A.M.F. & Nascimento, C.W.A. Caracterização de solos de Pernambuco quanto à supressividade a *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Fitopatologia Brasileira* 32: 222-228. 2007.
- Amir, H. & Alabouvette, C. Involvement of soil abiotic factors in the mechanisms of soil suppressiveness to Fusarium wilts. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 157-164. 1993.
- Anderson, T.R. & Patrick, Z.A. Soil vampyrellid amoebae that cause small perforations in conidia of *Cochliobolus sativus*. *Soil Biology and Biochemistry* 12: 159-167. 1980.
- Armon, R.; Dosoretz, C.; Yoirish, A.; Shelef, G. & Neeman, I. Survival of the phytopathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in sterile and non-sterile soil, sand and their admixture. *Journal of Applied Bacteriology* 79: 513-518. 1995.
- Arshad, M.A. & Martin, S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agro-ecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 88: 153-160. 2002.
- Baker, K.F. & Cook, R.J. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco. Freeman. 1974.
- Baker, R. & Chet, I. Induction of suppressiveness. In: Schneider, R.W. (Ed.) *Suppressive Soils and Plant Disease*. St Paul. APS Press. 1984. pp. 35-50.
- Barksdale, T.H.; Good, J.M. & Danielson, L.L. Tomato diseases and their control. *Agriculture Handbook* 203: 109. 1972.
- Berry, L.A.; Jones, E.E. & Deacon, J.W. Interaction of the mycoparasite *Pythium oligandrum* with other *Pythium* species. *Biocontrol Science and Technology* 3: 247-260. 1993.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) *Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário*. Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 79-96.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Solos supressivos. In: Michereff, F.; Andrade, D.E.G.T. & Menezes, M. (Eds.) *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. Recife. Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2005. pp. 125-152.
- Bettiol, W. & Morandi, M.A.B. *Trichoderma* in Brazil: history, research, commercialization and perspectives. *Proceedings, Xth Meeting of the Working Group - Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens: Molecular Tools for Understanding and Improving Biocontrol*, Interlaken, Switzerland. 2008. p. 49.
- Bettiol, W. & Santos, I. Efeito do Lodo de esgoto sobre fitopatogenos veiculaos pelo solo. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 16: 233-264. 2008.
- Bianchini, A.; Maringoni, A.C. & Carneiro, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A.; Carmargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. vol. 2. São Paulo. Ceres. 1997. pp. 376-399.
- Boehm, M.J. & Hoitink, H.A.J. Sustainance of microbial activity in potting mixes and its impact on severity of *Pythium* root rot of Poinsettia. *Phytopathology* 82: 259-264. 1992.
- Bollen, G.J. Non-target effects of pesticides on soil-borne pathogens. In: Hascoet, M.; Schuepp, H. & Steen, E. (Eds.) *Comportement et Effects Secondaires des Pesticides dans le Sol*. Versailles. INRA. 1984. pp. 11-26.
- Brady, N.C. *Natureza e Propriedade dos Solos*. 7ª. Ed. Rio de Janeiro. Freitas Bastos. 1989.
- Chakraborty, S. Population dynamics of amoebae in soils suppressive and non-suppressive to wheat take all. *Soil Biology and Biochemistry* 15: 661-664. 1983.

- Chakraborty, S. Survival of wheat take-all fungus in suppressive and non-suppressive soils. *Pedobiologia* 28: 13-18. 1985.
- Chef, D.G.; Hoitink, H.A.J. & Madden, L.V. Effects of organic components in container media on suppression of *Fusarium* wilt of chrysanthemum and flax. *Disease Control and Pest Management* 73: 279-281. 1983.
- Chellemi, D.O. & Porter, I.J. The role of plant pathology in understanding soil health and its application to productive agriculture. *Australasian Plant Pathology* 30: 103-109. 2001.
- Chen, W.D. & Hoitink, H.A.J. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 78: 314-322. 1988.
- Conn, K. L. & Lazarovits, G. Impact of animal manures on Verticillium wilt, potato scab, and soil microbial populations. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21: 81-92. 1999.
- Curl, E.A.; Gudauskas, R.T.; Harper, J.D. & Peterson, C.M. Effects of soil insects on populations and germination of fungal propagules. In: Parker, C.A.; Rovira, A.D.; Moore, K.; Wong, P.T.W. & Kollmorgen, J.F. (Eds.) *Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens*. St. Paul. APS Press. 1985. pp. 20-23.
- Davis, R. M.; Kimble, K. A. & Farrar, J. J. A third race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* identified in California. *Plant Disease* 72: 453. 1988.
- Domingues, F. Controle físico e biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi* em gengibre. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 2006.
- Dong, Y.H.; Zhang, X.F.; Xu, J.L. & Zhang, L.H. Insecticidal *Bacillus thuringiensis* silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 954-960. 2004.
- Elias, K. S.; Schneider, R. W. & Lear, M. M. Analysis of vegetative compatibility groups in nonpathogenic populations of *Fusarium oxysporum* isolated from symptomless tomato roots. *Canadian Journal of Botany* 69: 2089-2094. 1991.
- Emmert, E.A.B. & Handelsman, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. *FEMS Microbiology Letters* 171: 1-9. 1999.
- Fenille, R.C. & Souza, N.L. The role of the organic material amended and the soil moisture on the pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Kühn AG-4 HGI in snap bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34: 1959-1967. 1999.
- Fravel, D. Commercialization of biocontrol agents for use against plant pathogens. *Summa Phytopathologica* 34: 193. 2008. (Resumo).
- Garbeva, P.; Van Veen, J.A. & Van Elsas, J.D. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. *Annual Review of Phytopathology* 42: 243-270. 2004.
- Garibaldi, A.; Aloi, C. & Gullino, M.L. Biological control of grey mould of grapevine: reality or utopia. Proceedings, International Symposium on Plant-Protection Problems and Prospects of Integrated Control in Viticulture, Lisboa, Portugal. 1988a. pp.283-291.
- Garibaldi, A.; Brunatti, F. & Cugudda, L. Attività antagonistica nei confronti della tracheofusariosi del garofano di *Fusaria* non patogeni resistenti a benomyl. *Atti Giornate Fitopatologiche* 1: 481-490. 1988b.
- Gauch, F. & Ribeiro, W.R.C. Ocorrência de espécies de *Pythium* potencialmente micoparasitas, com oogônios equinulados em solos de Brasília, DF. *Fitopatologia Brasileira* 23: 176-179. 1998.
- Ghini, R.; Patrício, F.R.A.; Bettiol, W.; Almeida, I.M.G. & Maia, A.H.N. Effect of sewage sludge on suppressiveness soil-borne plant pathogens. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 797-805. 2007.
- Grattidge, R. & O'Brien, R. G. Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease* 66: 165-166. 1982.
- Habte, M. & Alexander, M. Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. *Applied Microbiology* 29: 159-164. 1975.
- Hoitink, H.A.J. & Boehm, M.J. Interaction between organic matter decomposition level, biocontrol agents and plant pathogens in soilborne disease. *Anais, 4ª Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas*, Campinas, SP. 1991. pp. 63-77.
- Höper, H. & Alabouvette, C. Importance of physical and chemical soil properties in the suppressiveness of soil to plant diseases. *European Journal of Soil Biology* 32: 41-58. 1996.
- Höper, H.; Steinberg, C. & Alabouvette, C. Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 955-967. 1995.

- Hornby, D. Suppressing soils. *Annual Review of Phytopathology* 21: 65-85. 1983.
- Hornby, D. (Ed.) *Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens*. Wallingford. CAB International. 1990.
- Huber, D.M. & Schneider, R.W. The description and occurrence of suppressive soils. In: Schneider, R.W. (Eds.) *Suppressive Soils and Plant Disease*. St. Paul. The American Phytopathological Society. 1982. pp. 1-7.
- Hyakumachi, M. Suppression and prevention in Rhizoctonia disease: mechanisms involved in disease decline. *Palestras, 5 Simpósio de Controle Biológico, Foz do Iguaçu, PR*. 1996. pp. 140-149.
- Janvier, C.; Villeneuve, F.; Alabouvette, C.; Edel-Hermann, V.; Matteile, T. & Steinberg, C. Soil health through soil disease suppression: Which strategy from descriptors to indicators? *Soil Biology & Biochemistry* 39: 1-23. 2007.
- Jones, J. P. Fusarium wilt. In: Jones, J. B.; Jones J. P.; Stall, R. E. & Zitter, T. A. (Eds.) *Compendium of Tomato Diseases*. St. Paul. APS Press. 1991. p. 15.
- Kikumoto, T. Ecological aspects of soft rot bacteria. Report of the Institute for Agricultural Research (Tohoku University) 31: 19-41. 1980.
- Kikumoto, T. Ecology and biocontrol of soft rot of Chinese cabbage. *Journal of General Plant Pathology* 66: 275-277. 2000.
- Kim, B-S. & Yeoung, Y.R. Suppression of bacterial rot on Chinese cabbage by calcium fertilizer treatment. *Research in Plant Disease* 10: 82-85. 2004.
- Kocks, C.G.; Ruissem, M.A.; Zadoks, J.C. & Duijkers, M.G. Survival and extinction of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in soil. *European Journal of Plant Pathology* 104: 911-923. 1998.
- Komada, H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Review of Plant Protection Research* 8: 114-125. 1975.
- Kurozawa, C. & Pavan, M. A. Doenças das cucurbitáceas. (abóbora, abobrinha, chuchu, melancia, melão, moranga, pepino). In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, O. A.; Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. 3ª. Ed. São Paulo. Ceres. 1997a. pp. 325-337.
- Kurozawa, C. & Pavan, M. A. Doenças do tomateiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, O. A.; Camargo, L. E. A. & Rezende, J. A. M. *Manual de Fitopatologia*. Vol. 2. 3ª. Ed. São Paulo. Ceres. 1997b. pp. 690-719.
- Larkin, R.P.; Hopkins, D.L. & Martin, F.N. Suppression of Fusarium wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. *Phytopathology* 86: 812-819. 1996.
- Lartey, R.T.; Curl, E.A.; Peterson, C.M. & Harper, J.D. Mycophagous grazing and food preference of *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) and *Onychiurus encarpatus* (Collembola: Onychiuridae). *Environmental Entomology* 18: 334-337. 1989.
- Laterrot H.; Blancard, D. & Couteaudier Y. Les Fusarioses de la tomate. P. H. M. *Revue Horticole*. 1988. 288 p.
- Lazarovits, G. Managing soilborne plant diseases through selective soil disinfestation by a knowledge based application of soil amendments. *Phytoparasitica* 32: 427-431. 2004.
- Lazarovits, G.; Tenuta, M. & Conn, K.L. Organic amendments as a disease control strategy for soilborne diseases of high-value agricultural crops. *Australasian Plant Pathology* 30: 111-117. 2001.
- Lazarovits, G.; Conn, K.L. & Abbasi, P.A. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. In: Vanachter, A. (Ed.) *Proceedings of the Sixth International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation*. [S.n., 2005]. pp. 215-222.
- Lazarovits, G.; Abassi, P. & Conn, K. Managing soil agro-ecosystems for environmental and plant health: back to the future. *Summa Phytopathologica* 32: 153-156. 2006.
- Lopes, C. A.; Reis, A. & Ávila, A. C. Doenças do tomateiro para mesa causadas por fungos, bactérias e vírus. *Informe Agropecuário* 24: 66-78. 2003.
- Lumsden, R.D. Development of *Gliocladium virens* for biological control of *Pythium* and *Rhizoctonia* damping-off diseases of seedlings. *Proceedings, 13<sup>rd</sup> International Plant Protection Congress, The Hague, The Netherlands*. 1995. pp. 385-388
- Luz, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4: 1-47, 1996.

- Mattos, L.P.V. Potencial de hidrolisado de peixe para o controle de fitopatógenos. Dissertação de Mestrado. Lavras MG. Universidade Federal de Lavras. 2007.
- Mattos, L.P.V. & Bettiol, W. Efeito de hidrolisado de peixe na severidade da murcha causada por fusaio oxysporum f. sp. lycopersici raça 3 em tomateiro. Summa Phytopatologica 34: 176. 2008. (Resumo).
- Mazzola, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. Annual Review of Phytopathology 42: 35-59. 2004.
- McLaren, D.L.; Huang, H.C. & Rimmer, S.R. Control of apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minutans* and *Talaromyces flavus*. Plant Disease 80: 1373-1378. 1996.
- Melo, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 4: 261-295. 1996.
- Melo, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Ecologia Microbiana. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 1998. pp. 87-116.
- Mew, T.W.; Ho, W.C. & Chu, L. Infectivity and survival of soft-rot bacteria in Chinese cabbage. Phytopathology 66: 1325-1327. 1976.
- Moody, S.A.; Pearce, T.G. & Dighton, J. Fate of some fungal spores associated with wheat straw decomposition on passage through the guts of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea longa*. Soil Biology and Biochemistry 28: 533-537. 1996.
- Morales, R.G.F.; Santos, I. & Danner, M.A. Efeito do chorume líquido de suínos na podridão do colo e tombamento de plântulas de feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. Fitopatologia Brasileira 32: 429-433. 2007.
- Nahas, E.; Delfino, J.H. & Assis, L.C. Atividade microbiana e propriedades bioquímicas do solo resultantes da aplicação de gesso agrícola na cultura do repolho. Scientia Agricola 54: 160-166. 1997.
- Pérombelon, M.C.M. & Hyman, L.J. Survival of soft rot *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* and *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in soil in Scotland. Journal of Applied Bacteriology 66: 95-106. 1989.
- Pérombelon, M.C.M. & Kelman, A. Ecology of the soft rot Erwinias. Annual Review of Phytopathology 18: 361-387. 1980.
- Pinto, Z.V. Desenvolvimento de substrato supressivo à murcha do crisântemo causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. chrysantemi. Tese de Doutorado. Botucatu SP. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". 2008.
- Pinto, Z.V. & Bettiol, W. Supressividade de substratos à *Fusarium oxysporum* para a produção de crisântemo. Fitopatologia Brasileira 31: 219-220. 2006.
- Reis, A.; Boiteux, L. S.; Gordiano, L. B.; Costa, H. & Lopes, C. A. Ocorrência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 em tomate no Brasil e seleção de novas fontes de resistência ao patógeno. Fitopatologia Brasileira 30: 195-198. 2005.
- Rodrigues-Kabana, R. & Calvet, C. Capacidad del suelo para controlar enfermedades de origen edáfica. Fitopatologia Brasileira 19: 129-138. 1994.
- Santos, J. R. M. Protocolo de Tecnologia: seleção para resistência a doenças em hortaliças. N.3. Tomateiro/Murcha-de-fusário. Brasília. Embrapa Hortaliças. 1999. 4 p. (Embrapa Hortaliças. Comunicado Técnico 11).
- Schneider, R.W. (Ed.) Suppressive Soils and Plant Disease. St. Paul. APS Press. 1982.
- Schuster, M.L. & Coyne, D.P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. Annual Review of Phytopathology 12: 199-221. 1974.
- Silva, A.M.F.; Mariano, R.L.R.; Michereff, S.J.; Silveira, E.B. & Medeiros, F.H.V. Levantamento da intensidade da podridão-mole da alface e couve-chinesa em Pernambuco. Caatinga 20: 84-93. 2007.
- Siqueira, J.O. & Franco, A.A. Biotecnologia do Solo - Fundamentos e Perspectivas. Brasília. Ministério da Educação - ABEAS, ESAL/FAEPE. 1988.
- Szczzech, M.; Rondonowski, W.; Brzeski, M.W.; Smolinska, U. & Kotowski, J.F. Suppressive effect of a commercial earthworm compost on some root infecting pathogens of cabbage and tomato. Biological Agriculture and Horticulture 10: 47-52. 1993.
- Tenuta, M.; Conn, K. L. & Lazarovits, G. Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 92: 548-552. 2002.

- Termorshuizen, A.J.; Van Rijn, E.; Van Der Gaag, D.J.; Alabouvette, C.; Chen, Y.; Lagerlof, J.; Malandrakis, A.A.; Paplomatas, E.J.; Ramert, B.; Ryckeboer, J.; Steinberg, C. & Zmora-Nahum, S. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 2461-2477. 2006.
- Togashi, J. Studies on the outbreak of the soft-rot disease of Chinese cabbage by *Erwinia aroideae* (Towns.) Holl. Report of the Institute for Agricultural Research (Tohoku University) 23: 17-52. 1972.
- Togashi, J. & Sakamoto, M. Studies on the outbreak of the soft-rot disease of Chinese cabbage. Report of the Institute for Agricultural Research (Tohoku University) 17: 17-26. 1966.
- Tokeshi, H. & Galli, F. Variabilidade de *Fusarium* f. *lycopersici* Sny & Hans em São Paulo. Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz 23: 217-227. 1966.
- Toyota, K.; Kitamura, M. & Kimura, M. Suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* PEG-4 in soil following colonization by other *Fusarium* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 27: 41-46. 1995.
- Urban, A. F. Molecular and genetic structure of populations of *Fusarium oxysporum* (Schlechtend Ex Fries) f. sp. *lycopersici* (Sacc) Snyder and Hansen and f. sp. *radicis lycopersici* Jarvis and Shoemaker. Ph.D. Thesis. Birmingham UK. Faculty of Science, University of Birmingham. 1994.
- Ureba, M.J.B.; Rodríguez, M.L.; Herrera, J.M.M.V. & Ligeró, A.M.P. Utilización Orgánicas y Cultivo Hidropónico en el Control de la Fusariosis del Clavel. Elucía. Consejería de Agricultura y Pesca. 2005.
- Valenzuela-Ureta, J. G.; Lawn, D. A.; Heisey, R. F. & Zamudionaloa, V. First report of *Fusarium* wilt race 3, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, of tomato in Mexico. *Plant Disease* 80: 105. 1996.
- Van Bruggen, A.H.C. & Semenov, A.M. A new approach to the search for indicators of root disease suppression. *Australasian Plant Pathology* 28: 4-10. 1999.
- Veras, M.S.; Silva, A. S. & Rodrigues, A. A. C. Incorporação de resíduos orgânicos no controle da fusariose em quiabeiros. *Revista Brasileira de Agroecologia* 2: 1190-1193. 2007.
- Vieira, F.C.S. & Nahas, E. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. *Scientia Agricola* 57: 539-545. 2000.
- Volin, R. B. & Jones, J. P. A new race of *Fusarium* wilt of tomato in Florida and sources of resistance. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* 95: 268-270. 1982.
- Wang, D.; Guaqing, L.; DooHong, J. & Shengxin, X. Sclerotinia species in Hubei Province and potential of *Coniothyrium minitans* as a biocontrol agent. In: Wenhua, T.; Cook, R.J. & Rovira, A. (Eds.) *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. Beijing. China Agricultural University Press. 1996. pp. 109-112.
- Weller, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407. 1988
- Weller, D.M.; Raaijmakers, J.M.; Gardener, B.B.M. & Thomashow, L.S. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 40: 309-348. 2002.
- Yogev, A.; Raviv, M.; Hadar, Y.; Cohen, R. & Katan, J. Plant waste-based composts suppressive to diseases caused by pathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology* 116: 267-278. 2006.

## Capítulo 13

# **Resíduos Orgânicos e Solarização para o Controle das Doenças do Feijoeiro Causadas por *Sclerotium rolfsii***

Idalmir dos Santos, Vanessa N. Tomazeli & Rafael G. F. Morales

*Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Coordenação de Agronomia,  
Caixa Postal 571 – 85503-390, Pato Branco PR, Brasil, e-mail: idalmir@utfpr.edu.br*

## **Introdução**

A murcha de *Sclerotium* do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) causada pelo fungo *Sclerotium rolfsii* causa o estrangulamento do colo, o que provoca murcha da parte aérea, seca, queda de folhas e morte da planta. Quando infesta o solo, esse patógeno provoca perdas na produtividade, ocasionada pelos tombamentos de pré e pós-emergência (Bianchini *et al.*, 1997), podendo seus escleródios sobreviver no solo por vários anos (Bueno *et al.*, 2004).

As atuais estratégias de controle como tratamento químico das sementes, resistência genética e rotação de culturas auxiliam na redução de inóculo do patógeno, mas apresentam baixa eficiência. As alternativas, como a utilização da solarização e a incorporação de resíduos orgânicos ao solo apresentam, em diversos casos, resultados significativos.

A solarização do solo é um método seguro e que não produz resíduos fitotóxicos, sendo relativamente barato e fácil de usar (Katan, 1980). O seu principal efeito consiste no aumento da temperatura promovida pela cobertura do solo com um filme plástico transparente, provocando a morte dos patógenos (Ghini, 1997). A técnica apresenta resultados positivos no controle de diversos patógenos veiculados pelo solo, inclusive para aqueles formadores de escleródios, como *Sclerotinia sclerotiorum* (Katan & Devay, 1991; Sousa, 1994) e *Sclerotium rolfsii* (Gamliel & Stapleton, 1993). A inativação desses patógenos pode ocorrer devido ao aquecimento do solo (Ferraz *et al.*, 2003), podendo estar associada também à ação de microrganismos com potencial para controle biológico tolerantes às altas temperaturas (Katan & Devay, 1991).

A incorporação de matéria orgânica pode induzir a supressividade a patógenos habitantes do solo (Hoitink & Bohem, 1991). Os compostos orgânicos podem atuar nos fitopatógenos diretamente pela produção de compostos químicos ou indiretamente favorecendo o aumento da comunidade de antagonistas, uma vez que a matéria orgânica ativa a microbiota, provoca alterações de pH e condutividade elétrica do solo, fatores que poderão induzir a supressividade aos patógenos (Martin & Hancock, 1986; Gamliel & Stapleton, 1993). Robbs (1991) relata o impacto da incorporação de resíduos orgânicos no estímulo à destruição biológica de escleródios de *Sclerotium rolfsii*. Santos & Bettiol (2003) verificaram que a adição de lodo de esgoto ao solo controlou a podridão do colo e o tombamento do feijoeiro, induzidas por *Sclerotium rolfsii*, reduzindo a severidade das doenças. Lazarovits (2001) constatou que uma aplicação de chorume de suínos reduziu por três anos consecutivos a murcha causada por *Verticillium dahliae*. A adição de chorume de suíno ao solo aumentou as populações microbianas e alterou a composição das espécies de microrganismos predominantes, sendo que o aumento dos níveis populacionais de *Trichoderma* foi evidente em muitos dos solos tratados. Ghini *et al.* (2002) observaram significativo controle do tombamento de plântulas de pepino, causado por *Pythium*, com a incorporação ao solo de cama de aviário. O solo submetido à criação de suínos ao ar livre foi supressivo a *Pythium aphanidermatum*, para o cultivo da mesma cultura (Tirelli *et al.*, 2003).

A quantidade e a forma dos nutrientes contidos no composto podem interferir no efeito sobre as doenças de plantas (Castagnone-Sereno & Kermarrec, 1991; Dissanayake & Hoy, 1999; Santos & Bettiol, 2001). A supressão da podridão de *Sclerotinia* em alface com lodo de esgoto foi associada ao aumento dos níveis de N, P, Ca e Mg no solo, bem como ao aumento da atividade microbiana (Lumsden *et al.*, 1986). O conteúdo de Ca do solo foi associado com a supressão de *Pythium splendens* (Kao, 1986) e o rompimento de oosporos de *Pythium* (Qian & Johnson, 1987). A presença de resíduo de repolho no solo foi associada ao aumento de aldeídos e isotiocianatos gerados em solo aquecido por meio da solarização, promovendo significativa redução de propágulos de *Pythium ultimum* (Gamliel *et al.*, 1993). Estes compostos são resultado do metabolismo secundário da planta e têm conhecido efeito no controle biológico (Taiz & Zeiger, 2004).

Cama de aviário e chorume de suíno apresentam uma concentração média de 3% de N, teor este considerado elevado (Konzen, 2003; Ghini *et al.*, 2002). Com isso há liberação de gases como a amônia ( $\text{NH}_3^+$ ), é tóxica em altas concentrações (Lazarovits, 2001). Este fato, aliado ao aumento da temperatura do solo, pode ampliar o efeito deletério dos compostos orgânicos em relação à fitopatógenos.

Os nutrientes minerais podem ter influência na resistência de plantas a doenças, devido às possíveis modificações na sua anatomia, tais como células da epiderme mais grossas, lignificadas e ou com altos teores de silício. Além de interferências nas suas propriedades fisiológicas e bioquímicas como a produção de substâncias inibidoras ou repelentes (Marschner, 1986).

A adição de resíduos orgânicos de origem animal ou vegetal ao solo para o controle de fitopatógenos é uma opção de uso em conjunto com a solarização. O controle de *Pythium ultimum* foi possível por meio da associação da solarização e compostos de cama de aviário ao solo (Gamliel & Stapleton, 1993). Com a



incorporação de resíduos de couve associados à solarização, Souza & Bueno (2003) observaram a morte de *Sclerotium rolfsii* em apenas 14 dias, decorrente do aumento da temperatura do solo.

Em um modelo sustentável de produção, deve ser priorizada a redução da utilização de produtos químicos. Entretanto, para alcançar tal êxito, é preciso conhecer todas as variáveis das alternativas de controle. Assim, o objetivo desse capítulo é discutir o efeito e os possíveis modos de ação de resíduos orgânicos e da solarização do solo sobre as doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro.

## **Resíduos Orgânicos Associados à Solarização para o Controle de Doenças do Feijoeiro Causadas por *Sclerotium rolfsii***

Os efeitos dos resíduos orgânicos associados à solarização do solo sobre *Sclerotium rolfsii* foram avaliados em parcelas de 1 m<sup>2</sup> contendo solo infestado, 20 dias antes da aplicação dos tratamentos, com 100 g/ parcela de arroz em casca colonizados pelo patógeno. O experimento foi repetido em duas épocas, com dois cultivos no primeiro ano e um cultivo no segundo. A solarização teve início em 05/01/2005 e 03/01/2006, sendo retirada após 60 e 90 dias, respectivamente. Antes do primeiro ensaio, foi realizado um cultivo para verificar a presença e a homogeneidade de ocorrência da doença nas parcelas. Os tratamentos utilizados foram: testemunha; chorume de suínos (60 m<sup>3</sup>/ha); cama-de-aviário (30 t/ha); e repolho triturado (40 t/ha), todos com e sem o uso da solarização, num fatorial 4x2, em delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. O chorume foi coletado na estação experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (Iapar) (pH de 9,2; 21% de matéria seca; 2,1% de P; 1,5% de K; e 1,4% de N total) e a cama de aviário foi adquirida junto à Seva (pH de 8,4; 83% de matéria seca; 3,5% de P; 2,8% de K; e 3,2% de N total). No tratamento com repolho foi utilizada a espécie *Brassica oleracea* var. *capitata* (9% de matéria seca; 0,5% de P; 2,5% de K; e 1,6% de N total). Os materiais orgânicos foram incorporados na profundidade de 10 cm e as parcelas foram irrigadas até a saturação do solo. As parcelas solarizadas foram cobertas com plástico transparente de 100 mm de espessura. A temperatura do solo foi monitorada diariamente, realizando-se leituras às 9 h, 11 h, 13 h e 15 h na profundidade de 5 cm, com sensor de temperatura do solo (termopar) acoplado a um multímetro modelo Teste Eletrônico DT-830B. Antes da semeadura foram coletados aproximadamente 500 g de solo, em seis pontos de cada parcela, para a avaliação da fertilidade do solo (Pavan & Miyazawa, 1996). A semeadura de 80 sementes de feijão por parcela, cultivar UTF-1 com 94% de poder germinativo, foi realizada uma semana após a retirada dos plásticos da solarização.

A intensidade da doença foi avaliada considerando-se a emergência de plantas, o estande final, a incidência e a severidade. As avaliações de emergência e estande final foram realizadas contando-se o número de plantas emergidas após 12 dias da semeadura e o total de plantas remanescentes após 24 dias.

Para a avaliação de incidência foi considerada a porcentagem de plantas infectadas, com sintomas visíveis do patógeno, em relação às plantas saudáveis. A severidade foi avaliada considerando a porcentagem de tecido lesionado no colo da planta, com base na escala diagramática para podridões radiculares do feijoeiro (Schoonhoven & Pastor-Corrales, 1987). Antes das avaliações de severidade, foi feita a identificação e a confirmação da doença causada por *Sclerotium rolfsii*, tendo em vista que as estruturas do fungo foram visualizadas nos tecidos das sementes que não germinaram e das plântulas que não emergiram do solo ou tombaram após a emergência. O patógeno foi também isolado dos tecidos do colo das plantas submetidas à avaliação da severidade. A atividade microbiana, avaliada pelo desprendimento de CO<sub>2</sub>, foi realizada conforme a metodologia descrita por Grisi (1978). Após as avaliações de incidência e severidade da doença, foi determinado o peso de matéria verde (g/planta). Também foi avaliado o número de escleródios por parcela, bem como a sua sobrevivência após o cultivo de feijão (Santos & Bettiol, 2003). O trabalho foi realizado no campo experimental da UTFPR, Unidade do Sudoeste, Campo de Pato Branco, latitude 26° 07' sul, longitude 52° 41' W e altitude de 700m.

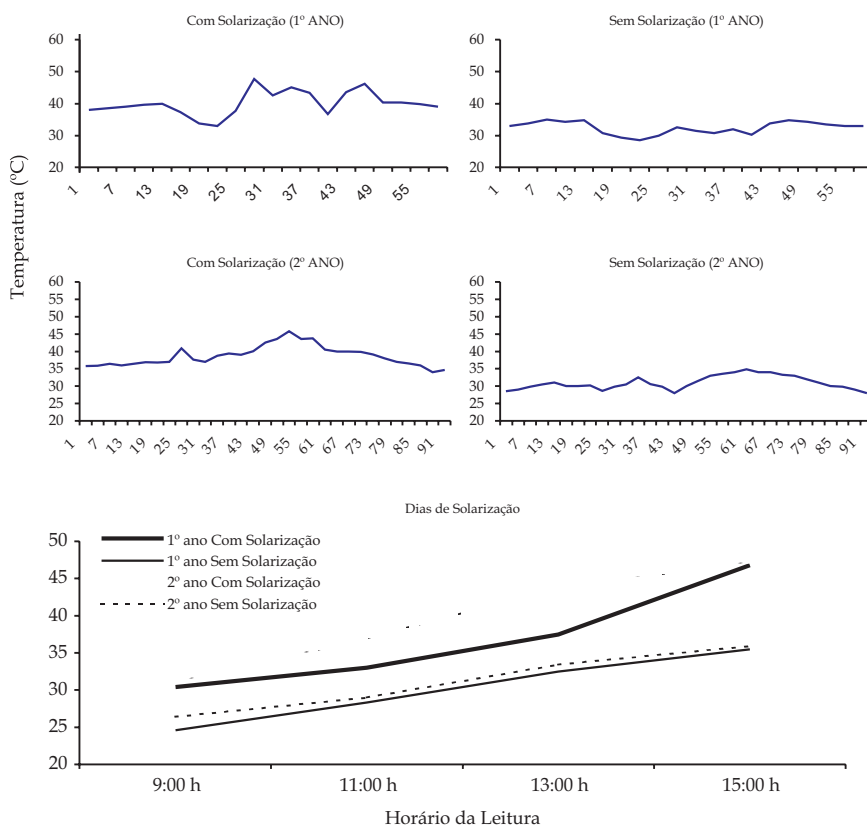
Nas parcelas solarizadas não houve diferença significativa entre os resíduos orgânicos e a testemunha, uma vez que a solarização reduziu a incidência e a severidade da doença a níveis baixos, impedindo a expressão do efeito da matéria orgânica. A redução da incidência e severidade nos tratamentos solarizados em relação aos não solarizados foi significativa para os três cultivos (Tabelas 1, 2 e 3). Essa redução está relacionada com o aumento da temperatura do solo. A média da temperatura registrada no primeiro ano nos canteiros solarizados foi de 46,8 °C e nos não solarizados de 36,5 °C (Figura 1). No segundo ano, as médias da temperatura foram de 43,2 °C e 35,5 °C, com e sem solarização, respectivamente. Ghini *et al.* (2002) encontraram diferença média de 11,5 °C entre solos solarizados e não solarizados. A temperatura máxima observada nos canteiros solarizados no primeiro ano foi 51 °C e no 2º ano 49,5 °C, valores superiores ao encontrado por Souza *et al.* (2002) que observaram redução acentuada na sobrevivência de *Phytophthora capsici* em parcelas solarizadas onde as temperaturas médias foram superiores a 45 °C.

Apesar da exposição do patógeno ao calor ser um importante fator, não é o único mecanismo envolvido no método. O aumento da temperatura pode exercer efeitos sobre a microbiota do solo (Katan *et al.*, 1981) e/ou potencializar os efeitos da biofumigação (Baptista *et al.*, 2006). Segundo Ghini (1997), os microrganismos saprófitas, entre eles muitos antagonistas, são mais tolerantes ao calor e competitivos que os patógenos de plantas. Em consequência, há uma alteração na composição microbiana em favor de antagonistas, que para Ferraz *et al.* (2003) dificulta a re-introdução de patógenos no solo, induzindo a sua supressividade.

Com a incorporação de resíduos orgânicos ao solo sem solarização, observou-se melhor desempenho da cama de aviário na redução da doença. Nos dois primeiros cultivos, não houve diferença na emergência. Entretanto, o estande final nas parcelas com cama de aviário foi maior que nos outros tratamentos, indicando sua ação no controle de tombamento de plântulas (Tabelas 1, 2, 3 e 5). A superioridade da cama de aviário sobre a emergência de plântulas foi gradativa no

decorrer dos três cultivos, traduzindo-se em benefício cumulativo ao longo dos dois experimentos. Em comparação aos demais resíduos, a cama de aviário apresenta teores maiores de matéria seca, P, N e K, proporcionando melhores condições de crescimento das plantas (Tabelas 4, 6 e 7). Esses nutrientes podem estar relacionados com o seu efeito no controle de tombamento. Para Zambolim & Ventura (1993), o P aumenta a resistência das plantas às doenças por acelerar a maturação dos tecidos, auxiliando-a a escapar da infecção por patógenos que tem preferência por tecidos jovens, como é o caso do *Sclerotium rolfsii*, onde a fase de plântula do feijoeiro é apontada como a mais suscetível, justamente devido à baixa lignificação e quantidade de pectato de cálcio nos tecidos.

A redução da incidência e severidade da doença no tratamento com cama de aviário, nos dois primeiros cultivos (Tabelas 1 e 2), pode ser relacionada ao menor tombamento de plantas. No cultivo único realizado no segundo experimento, os três resíduos orgânicos foram efetivos na redução tanto da incidência quanto da severidade da doença (Tabela 3).



**Figura 1.** Temperatura do solo a 5 cm de profundidade durante o período de solarização. Os dados são médias de quatro leituras diárias.

**Tabela 1.** Efeito dos resíduos orgânicos, associado ou não à solarização do solo, sobre a emergência, o estande final de plântulas de feijoeiro e sobre a incidência e a severidade da podridão do colo causada por *Sclerotium rolfsii*, no primeiro cultivo de 2005.

Tratamento	Emergência (%)**		Estande Final (%)**		Incidência (%)**		Severidade (%)**	
	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S
Testemunha	75,63 aA*	72,50 AA	62,50 bA	71,25 aA	74,16 aA	39,04 aB	28,44 aA	1,46 aB
Chor. de Suínos	78,75 aA	78,75 AA	65,00 bA	74,38 aA	75,75 aA	38,83 aB	24,31 aA	1,31 aB
Cama de Aviário	78,75 aA	76,88 aA	73,13 aA	72,50 aA	47,17 bA	33,54 aA	10,37 bA	1,76 aB
Repolho triturado	72,50 aA	84,38 aA	62,50 bA	68,13 aA	72,10 aA	52,81 aB	22,96 aA	3,09 aB
Média	76,41 A	78,13 A	65,78 A	71,56 A	67,30 A	41,06 B	21,52 A	1,91 B
C.V.	17,72	22,36	20,89	17,54	1,37	2,58	11,71	9,46

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si (Duncan 5%). Para análise, os dados foram transformados em raiz ( $X + 0,5$ ). C/S = com solarização; S/S = sem solarização.

**Tabela 2.** Efeito dos resíduos orgânicos, associado ou não à solarização do solo, sobre a emergência, o estande final de plântulas de feijoeiro e sobre a incidência e a severidade da podridão do colo causada por *Sclerotium rolfsii*, no cultivo de 2006.

Tratamento	Emergência (%)**		Estande Final (%)**		Incidência (%)**		Severidade (%)**	
	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S
Testemunha	83,13 aA*	82,50 aA	78,44 bA	82,19 aA	65,01 aA	19,11 aB	25,42 aA	1,94 aB
Chor. de Suínos	77,81 aA	85,31 aA	78,13 bA	85,31 aA	49,32 bA	16,87 aB	13,04 bA	1,62 aB
Cama de Aviário	83,44 aA	76,88 aA	83,44 aA	76,88 aA	40,91 cA	6,32 bB	8,85 cA	0,73 aB
Repolho triturado	81,88 aA	81,25 aA	79,06 bA	81,25 aA	56,07 abA	16,15 aB	20,05 aA	1,99 aB
Média	81,56 A	81,48 A	79,77 A	81,41 A	52,83 A	14,61 B	16,84 A	1,57 B
C.V.	21,56	21,87	25,36	22,22	3,54	4,56	10,58	12,10

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si (Duncan 5%). Para análise, os dados foram transformados em raiz ( $X + 0,5$ ). C/S = com solarização; S/S = sem solarização.

**Tabela 3.** Efeito dos resíduos orgânicos, associado ou não à solarização do solo, sobre a emergência, o estande final de plântulas de feijoeiro e sobre a incidência e a severidade da podridão do colo causada por *Sclerotium rolfsii*, no cultivo de 2006.

Tratamentos	Emergência (%)**		Estande Final (%)**		Incidência (%)**		Severidade (%)**	
	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S
Testemunha	67,19 cA*	81,88 aB	66,36 cA	80,16 aA	46,68 aA	31,38 aB	13,17 aA	4,80 aB
Chor. de Suínos	74,38 BA	74,69 aA	73,46 bA	73,12 aA	28,13 bA	26,50 aA	4,96 bA	4,25 aA
Cama de Aviário	78,44 AA	77,81 aA	77,47 aA	76,18 aA	25,48 bA	24,23 aA	3,98 bA	3,75 aA
Repolho triturado	74,06 BA	79,38 aA	73,15 bA	77,71 aA	26,93 bA	27,95 aA	5,43 bA	3,23 aA
Média	73,52 A	78,44 A	72,61 A	76,79 A	31,81 A	27,52 B	6,89 A	4,01 B
C.V.	12,45	17,56	13,69	20,58	2,58	5,89	17,96	12,87

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si (Duncan 5%). Para análise, os dados foram transformados em raiz ( $X + 0,5$ ). C/S = com solarização; S/S = sem solarização.

**Tabela 4.** Avaliação de matéria verde, teor de matéria orgânica do solo, atividade microbiana e número de escleródios, após o segundo cultivo de 2005.

Tratamentos	Matéria Verde (g planta <sup>-1</sup> )		Matéria Orgânica (mg dm <sup>-3</sup> )				Ativ. Microbiana (mg CO <sup>2</sup> 100g solo <sup>-1</sup> )		Nº de Escleródios (Nº 50g solo <sup>-1</sup> )							
			S/S		C/S		S/S		C/S							
	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S						
Testemunha	3,71	bA*	3,76	bA	22,15	BA	30,26	aA	9,05	cA	6,89	cB	35,50	aA	12,25	aB
Chor. de Suínos	6,47	abA	5,98	aA	34,85	AA	32,67	aA	15,41	aA	15,64	aA	22,25	bA	9,50	aB
Cama de Aviário	8,43	AA	7,95	aA	34,51	AA	31,83	aA	15,35	aA	15,12	aA	23,15	bA	10,25	aB
Repolho triturado	4,31	BA	3,95	bA	33,17	AA	32,33	aA	12,22	bA	10,77	bA	22,00	bA	8,75	aB
Média	5,73	A	5,41	A	31,17	A	31,77	A	13,01	A	12,11	A	25,73	A	10,19B	
C.V.	2,56		3,24		1,58		1,99		7,82		7,96		0,45		23,69	

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si (Duncan 5%). C/S = com solarização; S/S = sem solarização.

**Tabela 5.** Porcentagem de tombamento de plântulas de feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*, em três cultivos sucessivos de feijão em solos com incorporação de fontes de matéria orgânica.

Tratamento	Tombamento (%)		
	1º Ano		2º Ano
	1º cultivo	2º cultivo	Cultivo Único
Testemunha	17,36 b	5,64 b	1,77 b
Chorume de Suínos	17,46 b	4,14 b	0,30 a
Cama de Aviário	7,14 a	0,00 a	0,43 a
Repolho triturado	17,22 b	3,44 b	1,23 b

**Tabela 6.** Análise de fósforo (P) e potássio (K) no solo no primeiro e segundo experimentos.

Tratamentos	Fósforo (mg /dm <sup>-3</sup> )**				Potássio (cmol(c)/ dm <sup>-3</sup> )											
	1º Ano		2º Ano		1º Ano		2º Ano									
	S/S	S/S	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S								
Testemunha	9,25	aA*	8,12	aA	7,6	BA	7,75	aA	0,35	AA	0,28	aA	0,21	bA	0,27	bA
Chor. de Suínos	5,8	AA	6,12	aA	6,87	BA	6,88	aA	0,26	AA	0,25	aA	0,38	bA	0,43	bA
Cama de Aviário	6,16	AA	7,08	aA	54,7	AA	60,6	bB	0,25	AA	0,24	aA	1,00	aA	1,27	aB
Repolho triturado	6,33	AA	7,98	aA	9,48	BA	9,39	aA	0,28	AA	0,27	aA	0,47	bA	0,58	bA

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si (Duncan 5%).

\*\*Extrator Mehlich-1. C/S = com solarização; S/S = sem solarização.

**Tabela 7.** Avaliação de matéria verde, teor de matéria orgânica do solo, atividade microbiana e número de escleródios, após o cultivo de 2006.

Tratamentos	Matéria Verde		Matéria Orgânica		Ativ. Microbiana		Nº de Escleródios	
	(g/planta <sup>-1</sup> )		(mg/dm <sup>3</sup> )		(mg CO <sub>2</sub> /100g/solo <sup>-1</sup> )		(Nº /50g/solo)	
	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S	S/S	C/S
Testemunha	7,54 bA*	3,93 bB	21,78 bA	18,43 bA	13,62 bA	3,96 cB	55,25 aA	28,75 aA
Chor. de Suínos	7,56 bA	4,49 bB	23,45 bA	23,45 bA	28,47 aA	10,00 aB	23,50 bA	26,00 abA
Cama de Aviário	16,61 aA	11,77 aB	26,48 aA	30,91 aA	32,13 aA	10,15 aB	18,25 bA	24,25 abA
Repolho triturado	7,49 bA	4,50 bB	23,45 bA	24,46 bA	22,91 aA	8,19 bB	16,00 bA	23,00 bA
Média	9,80 A	6,17 B	23,79 A	24,31 A	24,28 A	8,08 B	28,25 A	25,50 A
C.V.	6,78	9,16	2,59	1,98	8,96	10,28	22,36	20,69

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si (Duncan 5%). C/S = com solarização; S/S = sem solarização.

O efeito deletério dos resíduos orgânicos sobre fitopatógenos é atribuído principalmente à atividade microbiana estimulada pela incorporação dos resíduos ao solo, promovendo desta forma o antagonismo entre microrganismos presentes no ambiente. Para Rodrigues-Kábana & Calvet (1994), a incorporação de matéria orgânica ao solo pode alterar a composição e a atividade da microbiota e as características físicas e químicas, tornando-o supressivo à diversos fitopatógenos. A redução da incidência da doença pode ainda ser atribuída ao aumento das defesas da planta hospedeira, ou devida à inibição direta da atividade ou crescimento do patógeno (Hoitink & Fahy, 1986).

Nos tratamentos sem solarização, o maior número de escleródios por parcela foi encontrado na testemunha, enquanto que os três compostos orgânicos não diferiram entre si (Tabela 4). Nas parcelas solarizadas, não houve diferença entre os tratamentos, uma vez que nesse caso a solarização atuou sobre o patógeno, reduzindo a formação de escleródios (Tabela 4). Elad *et al.* (1980) observaram que a exsudação dos escleródios de *Sclerotium rolfsii* em solos solarizados foi estimulada, aumentando a sua colonização e destruição por bactérias. A redução do número de escleródios pode ainda ser atribuída ao aumento da temperatura promovido pela solarização. Ferraz *et al.* (2003) observaram que a temperatura provoca fissuras no anel de proteção dos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*, o que facilita o ataque de microrganismos antagonísticos como bactérias atraídas pelas exsudados do patógeno, efetivando ainda mais o seu controle.

A redução nos níveis da doença observado nos tratamentos com resíduos, em função do aumento da atividade microbiana do solo (Tabela 7), pode ser devido à ação antagônica entre os microrganismos (Millner *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1987). Os baixos valores da atividade microbiana nos dois cultivos do primeiro ano de avaliação pode ter sido decisivo para a ausência de diferença na emergência. A atividade microbiana, medida pela liberação de CO<sub>2</sub>, apesar de diferir estatisticamente, apresentou valores baixos (Tabela 4).

Além de o CO<sub>2</sub> indicar uma maior atividade microbiana no solo, por si só pode inibir a germinação do patógeno. Barreto *et al.* (1997) afirmam que *Sclerotium rolfsii* é altamente exigente em oxigênio e este fato limita a germinação de escleródios

em solos pesados e o desenvolvimento do patógeno só ocorre próximo à superfície. Porém, sua inabilidade para atingir as plantas se relaciona com a sua sensibilidade ao CO<sub>2</sub>, o qual é produto do crescimento microbiano e que, se transforma em mecanismo de antagonismo (Griffin, 1977). Foi constatado por Smith (1973) que em solos submetidos a ar contendo 0,1 ppm de etileno escleródios de *Sclerotium rolfsii* permaneceram dormentes. É possível que o incremento de matéria orgânica proporcionada pelos resíduos orgânicos (Tabela 4 e 7), tenha contribuído para o crescimento microbiano e maior quantidade de CO<sub>2</sub> quando comparada à testemunha.

Apesar de ser observado um efeito benéfico da cama de aviário na redução da incidência e severidade da doença e no tombamento de plântulas causadas por *Sclerotium rolfsii*, a intensidade da doença no experimento foi alta. Este fato pode ser explicado pelo alto potencial de inóculo do patógeno, situação raramente encontrada em condições de cultivo.

## **Efeito do Chorume de Suínos na Podridão do Colo e Tombamento de Plântulas de Feijoeiro Causadas por *Sclerotium rolfsii***

O efeito do chorume de suínos sobre *Sclerotium rolfsii* foi avaliado em parcelas de 1 m<sup>2</sup>, infestadas dois meses antes da aplicação do chorume, de acordo com a metodologia descrita. O delineamento experimental foi de blocos casualizados, com quatro repetições e cinco tratamentos, com doses equivalentes a 0, 20, 40, 60 e 80 m<sup>3</sup>/ha, em uma única aplicação. O chorume foi coletado na estação experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (Tabela 8). Foram realizados dois cultivos sucessivos de feijão, com a semeadura de 80 sementes por parcela, no dia seguinte e 45 dias após a aplicação do chorume, respectivamente. A cultivar utilizada foi a UTF-1, com 94% de poder germinativo. Durante o primeiro cultivo, de 11/03/2004 a 03/04/2004, a temperatura mínima diária variou de 12,8 °C a 19,4 °C, a temperatura máxima de 23,2 °C a 32,6 °C, a temperatura média de 18,7 °C a 23,3 °C, a umidade relativa do ar de 45% a 92% e a precipitação pluviométrica total foi de 50 mm. No segundo cultivo, de 26/04/2004 a 19/05/2004, a temperatura mínima diária variou de 4,6 °C a 15,6 °C, a temperatura máxima de 14 °C a 26,6 °C, a temperatura média de 9,6 °C a 18,8 °C, a umidade relativa do ar de 65% a 99% e a precipitação pluviométrica total foi de 148 mm. Ocorreu precipitação pluviométrica em apenas três e seis dias, no primeiro e segundo cultivo, respectivamente, por isso, foi efetuada a irrigação das parcelas.

A intensidade da doença foi avaliada considerando-se a emergência de plantas, o estande final e a severidade. A atividade microbiana, a concentração de amônia (NH<sub>3</sub>) na camada superficial do solo e os níveis de fertilidade foram avaliados apenas no segundo cultivo. As metodologias foram semelhantes às descritas.

Com as doses crescentes de chorume verificou-se redução da intensidade da doença, e aumento da emergência de plântulas. Outro fator que evidenciou o efeito positivo na proteção do feijoeiro contra o patógeno foi o estande final de plântulas (Tabela 9). O efeito do chorume sobre a severidade da doença foi expressivo nos dois cultivos. No primeiro cultivo, a severidade foi de 60,5% na testemunha, sendo reduzida para 43,2% na maior dose ( $r^2 = 0,98$ ). A severidade da doença, no segundo cultivo foi de 56% na testemunha e 41,1% na maior dose de chorume ( $r^2 = 0,89$ ). O aumento dos níveis de matéria orgânica correlacionou-se com o aumento da atividade microbiana, avaliada por meio do desprendimento de  $\text{CO}_2$  (Tabela 10) e, possivelmente, influenciou a relação patógeno-hospedeiro, resultando em supressão da doença. O aumento da atividade microbiana, induzido pelas doses crescentes de chorume, parece ser o fator principal relacionado com a redução das doenças. O aumento do desprendimento de  $\text{CO}_2$  explicou em 95% o aumento da emergência e do estande final de plântulas e em 93% a redução da severidade da doença, pela análise de correlação (Tabela 10). Dissanayake & Hoy (1999) concluíram que o aumento da atividade microbiana, provocada pela aplicação de matéria orgânica ao solo e a própria microbiota contida no material orgânico, foram os responsáveis pelo controle de doenças em pepino e cana-de-açúcar causadas por *Pythium ultimum* e *Pythium aphanidermatum*, respectivamente.

As doses crescentes de chorume não alteraram o pH de forma expressiva, não sendo possível relacioná-lo como um fator isolado que tenha atuado sobre o fitopatógeno ou na manifestação das doenças (Tabelas 9). No entanto, as principais reações que ocorrem no solo são influenciados pelo pH. Para Lazarovits (2001) o pH é determinante para o controle de *Verticillium dahliae* na presença de chorume, visto que em  $\text{pH} < 6$  os ácidos graxos voláteis são provavelmente responsáveis pelo controle do fitopatógeno, enquanto que em pH alcalino, ( $> 8$ ) aumenta a liberação de amônia. Em trabalhos posteriores, Tenuta *et al.* (2002) e Conn *et al.* (2005) observaram que a concentração de chorume utilizada, a sua composição química e as características de solo, principalmente o pH, influenciaram na liberação de compostos químicos no solo, como a amônia, ácidos graxos voláteis e ácido nitroso, os quais tiveram efeito tóxico aos microescleródios de *Verticillium dahliae*. Conn *et al.* (2005) ratificam as informações da maior toxicidade da amônia em pH alcalino e dos ácidos voláteis em pH ácido e acrescenta o efeito tóxico de ácido nitroso em pH ácido. No presente trabalho o pH do solo variou entre 5,5 e 5,8. Portanto é possível que os ácidos graxos voláteis e o ácido nitroso tenham afetado o patógeno.

Mesmo se tratando de um solo ácido, o aumento da concentração de amônia na camada superficial do solo foi relacionado com a redução da doença (Tabela 10). Sua concentração aumentou de 32,1 mg/kg de solo na testemunha, para 45,6 mg/kg de solo na maior dose ( $r^2 = 0,99$ ) (Tabela 11). O aumento da concentração da amônia explicou em 89% o aumento da emergência, em 91% o aumento do estande e em 93% a redução da severidade da doença (Tabela 10). Quando os microrganismos degradam compostos com alto teor de nitrogênio, como é o caso do chorume, o excedente pode ser liberado na solução do solo como amônia ( $\text{NH}_3$ ), que em concentrações altas foi tóxica à *Verticillium dahliae* (Lazarovits, 2001). O fato de a amônia ter atuado na redução da doença em solo com pH ácido, pode ser explicado devido às altas doses de chorume utilizadas, o tipo de solo, o mecanismo de ação e a estrutura do fitopatógeno atingida. Segundo Tenuta & Lazarovits (2002), a adição



de rejeitos de carne e ossos, à 2,5%, a um solo areno-argiloso ácido resultou no acúmulo de amônia e na morte de microescleródios de *Verticillium dahliae*.

Conn *et al.* (2005) afirmam que as características do chorume (conteúdo de ácidos graxos voláteis, amônia e capacidade tamponante de pH) determinam o seu potencial para a formação de compostos letais no solo. Também afirmam que as propriedades físicas, químicas (pH, conteúdo de matéria orgânica e capacidade tamponante) e biológicas (degradação dos ácidos graxos voláteis e taxa de nitrificação), temperatura e umidade do solo determinam a formação e concentração finais desses compostos. A combinação de características físicas, químicas e biológicas do latossolo vermelho distrófico, associado à composição e concentração do chorume utilizados neste trabalho, pode ter favorecido o acúmulo de amônia em concentração suficiente para reduzir a ação de *Sclerotium rolfsii* sobre o feijoeiro. Tenuta *et al.* (2002) afirmam que a amônia é capaz de penetrar rapidamente nas membranas das células sendo tóxica aos microrganismos.

Com relação aos nutrientes avaliados no solo, apenas os incrementos nas concentrações de Zn e Cu podem ser relacionados ao potencial do chorume em suprimir as doenças induzidas por *Sclerotium rolfsii* (Tabela 11). Segundo Zambolim & Ventura (1993), o zinco pode aumentar o conteúdo de ácido ascórbico e carboidratos das plantas, conferindo dessa forma a resistência no algodoeiro à murcha de *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*.

**Tabela 8.** Características físicas e químicas do chorume de suínos utilizado no experimento.

Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	1,60
pH (água)	7,4
N (g/kg)	31,50
P (g/kg)	21,78
K (g/kg)	97,0
Ca (g/kg)	28,48
Mg (g/kg)	9,20
Cu (mg/kg)	2489,9
Zn (mg/kg)	1387,6
Mn (mg/kg)	375,37
B (mg/kg)	166,63
Cr (mg/kg)	104,48
Co (mg/kg)	14,04
Ni (mg/kg)	21,07
Pb (mg/kg)	28,66
Cd (mg/kg)	5,20

Valores obtidos com base na matéria seca.

**Tabela 9.** Efeito do chorume líquido de suínos sobre a emergência de plantas, o estande final e a severidade da doença em plantas de feijoeiro, causada por *Sclerotium rolfsii* no 1º e 2º cultivos e o pH, a atividade microbiana (liberação de CO<sub>2</sub>) e a concentração de amônia no solo no 2º cultivo após a incorporação do chorume.

1º cultivo	Doses de Chorume de suínos (m <sup>3</sup> /ha)						r <sup>2</sup>	C.V.
	0	20	40	60	80			
Emergência (%)	34,1	35,4	41,3	43,5	46,7	0,96	9,1	
Incremento na emergência (%)	-	4,1	21,4	27,8	37,1	-	-	
Estande final (%)	28,6	32,5	38,4	40,7	43,2	0,94	12,4	
Incremento no estande final (%)	-	13,5	34	42,3	51	-	-	
Severidade da doença (%)	60,5	56,2	50,1	48	43,2	0,98	8,4	
pH	5,7	5,5	5,8	5,5	5,6	NS	0,6	
2º cultivo	0	20	40	60	80	r <sup>2</sup>	C.V.	
Emergência (%)	40,8	44,1	52,1	54	54,8	0,91	7	
Incremento na emergência (%)	-	8,2	27,5	32,6	34,1	-	-	
Estande final (%)	32,5	34,6	48,9	53,4	53,5	0,87	6	
Incremento no estande final (%)	-	6,3	50,2	64,3	64,6	-	-	
Severidade da doença (%)	56	49,2	47,6	39,7	41,1	0,89	6,7	
pH	5,6	5,6	5,8	5,6	5,6	NS	1,2	
CO <sub>2</sub> (mg/100 g de solo seco)	12,2	13,2	15	16,5	18	0,96	7	
Amônia (mg/kg de solo)	32,1	33,1	36,3	43,7	45,6	0,99	10,1	

\*Média de 4 parcelas, NM: não mensurado; NS: não significativo a 5% de probabilidade de erro pelo teste F.

**Tabela 10.** Coeficiente de correlação entre a emergência, o estande final, a severidade das doenças causadas por *Sclerotium rolfsii* em feijoeiro e a matéria orgânica, com a atividade microbiana (CO<sub>2</sub>), a amônia (NH<sub>3</sub>), o zinco e o cobre do solo contendo chorume de suínos, no segundo cultivo.

	CO <sub>2</sub>	NH <sub>3</sub>	Zinco	Cobre
Emergência	0,95	0,89	0,96	0,89
Estande Final	0,95	0,91	0,96	0,89
Severidade	-0,93	-0,93	-0,95	-0,98
Matéria Orgânica	0,90	0,97	0,99	0,87

**Tabela 11.** Níveis de matéria orgânica e nutrientes na camada superficial do solo (0-10 cm), após a incorporação de doses crescentes (m<sup>3</sup>/ha) de chorume de suínos.

	0*	20	40	60	80	r <sup>2</sup>
M.O. (g/dm <sup>3</sup> )	50,3	50,3	50,3	55,3	59,6	0,78
NO <sub>3</sub> (mg/kg)	105,7	125,0	101,0	102,6	103,8	NS
P (mg/dm <sup>3</sup> )	20,3	25,3	23,0	23,1	32,0	NS
K (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	0,7	0,8	0,6	0,6	0,6	NS
Ca (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	5,7	4,3	6,5	6,3	5,4	NS
Mg (cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	4,1	3,01	4,2	4,2	3,3	NS
Zn (mg/dm <sup>3</sup> )	7,0	10,9	16,1	20,6	24,0	0,99
Cu (mg/dm <sup>3</sup> )	4,7	4,8	4,8	5,0	4,9	0,79
Mn (mg/dm <sup>3</sup> )	105,0	68,5	93,8	108,1	99,3	NS
Fe (mg/dm <sup>3</sup> )	58,3	54,1	56,3	51,8	56,1	NS

## Considerações Finais

O potencial de utilização de resíduos orgânicos na agricultura, especialmente em cultivos intensivos, é promissor. No cenário econômico da agricultura do sudoeste do Paraná e oeste de Santa Catarina destaca-se a avicultura e a suinocultura, gerando resíduos, cuja disposição final mais adequada é o solo utilizado para o cultivo. As vantagens destes resíduos como condicionador do solo e fornecedores de micro e macronutrientes são conhecidas. A utilização de cama de aviário e, principalmente, de dejetos de suínos para tornar os solos supressivos aos fitopatógenos residentes, faz parte de estudos mais recentes. No entanto, ainda é necessário testar a ação destes resíduos em vários patossistemas, pois não é possível generalizar os resultados obtidos até o momento para todas as culturas e fitopatógenos. No trabalho foram discutidos os diferentes mecanismos de ação dos resíduos sobre *Sclerotium rolfsii*, demonstrando uma efetiva ação múltipla. Porém, o controle biológico natural do solo estimulado pelos resíduos, expresso pela atividade microbiana parece ser o principal fator relacionado à redução da ação patogênica nas plantas, bem como na infestação do solo.

## Referências

- Baptista, M. J.; Lopes, C. A.; Souza, R. B. & Furumoto, O. Efeito da solarização e biofumigação, durante o outono, na incidência de murcha bacteriana e produtividade da batata. *Horticultura Brasileira* 24: 99-102. 2006.
- Barreto, M. Doenças do amendoim. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. & Rezende, J.A.M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3ª. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. v. 2, pp. 65-77.
- Bianchini, A.; Maringoni, A.C. & Carneiro, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamim Filho, A.; Camargo, L.E.A. & Resende, J.A.M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 3a. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. pp. 376-399.
- Blum, L.E.B. & Rodriguez-Kábana, R. Effect of soil organic amendments on sclerotial germination, mycelial growth, and *Sclerotium rolfsii*-induced diseases. *Fitopatologia Brasileira* 29: 66-74. 2004.
- Blum, L.E.B. & Rodríguez-Kábana, R. Powders of kudzu, velvetbean and pine bark added to soil increase microbial population and reduce southern blight of soybean. *Fitopatologia Brasileira* 31: 551-556. 2006.
- Bueno, C.J.; Ambrósio, M.M.Q.; Souza, N.L. & Cerezini, P.C. Controle de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* raça 2, *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotium rolfsii* em microcosmo simulando solarização com prévia incorporação de couve (*Brassica oleracea* var. *acephala* L.). *Summa Phytopathologica* 30: 356-363. 2004.
- Castagnone-Sereno, P. & Kermarrec, A. Invasion of tomato roots and reproduction of *Meloidogyne incognita* as assecteby raw sewage sludge. *Journal of Nematology* 23: 734-738. 1991.
- Chen, W.; Hoitink, H.A.J. & Schmitthenner, A.F. Factors affecting suppression of Pythium damping-off in container media amended with composts. *Pythopathology* 77: 755-760. 1987.
- Conn, K.L.; Tenuta, M. & Lazarovits, G. Liquid swine manure can kill *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil by volatile fatty acid, nitrous acid, and ammonia toxicity. *Phytopathology* 95: 28-35. 2005.
- Dissanayake, N. & Hoy, J.W. Organic material soil amendment effects on root rot and sugarcane growth and characterization of the materials. *Plant Disease* 83: 1039-1046. 1999.
- Elad, Y.; Katan, J. & Chet, I. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne diseases of potatoes. *Phytopathology* 70: 418-422, 1980.

- Ferraz, L.C.L.; Bergamin Filho, A.; Amorim, L. & Nasser, L.C.B. Viabilidade de *Sclerotinia sclerotiorum* após a solarização do solo na presença de cobertura morta. *Fitopatologia Brasileira* 28: 17-26. 2003.
- Gamliel, A.; Hadar, E. & Katan, J. Improvement of growth and yield of *Gypsophila paniculata* by solarization or fumigation of soil or container medium in continuous cropping systems. *Plant Disease* 77: 933-938. 1993.
- Gamliel, A & Stapleton, J.J. Characterization of antifungal volatile compounds evolved from solarized soil amended with cabbage residues. *Phytopathology* 83: 899-905. 1993.
- Ghini, R. Desinfestação do Solo com o Uso de Energia Solar: solarização e coletor solar. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA. 1997.
- Ghini, R.; Shoenmaker, I.A.S. & Bettiol, W. Solarização do solo, associada a incorporação de fontes de matéria orgânica no controle de *Pythium* spp. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 37: 1253-1261. 2002.
- Griffin, D.M. & Nair, N.G. Growth of *Sclerotium rofsii* at different concentration of oxygen and carbon dioxide. *Journal of Experimental Botany* 19: 812-816. 1968.
- Griffin, D.M. Water potential and wood-decay fungi. *Annual Review of Phytopathology* 15: 319-329. 1977.
- Grisi, B. M. Método químico de medição da respiração edáfica: alguns aspectos técnicos. *Ciência e Cultura* 30: 82-88. 1978.
- Hoitink, H.A.J. & Bohem, M.J. Interactions between organic matter decomposition level, biocontrol agents and plant pathogens in soilborne disease. *Anais, IV. Reunião Brasileira Sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas*, Campinas, SP. 1991. pp. 63-76.
- Hoitink, H.A.J. & Fahy, P.C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Annual Review of Phytopathology* 24: 93-114. 1986.
- Kao, C.W. & Ko, W.H. The role of calcium and microorganisms in suppression of cucumber damping-off caused by *Pythium splendens* in a Hawaiian soil. *Phytopathology* 76: 221-225. 1986.
- Katan, J. Solar pasteurization of soils for disease. *Plant Disease* 64: 450-454. 1980.
- Katan, J. & Devay, J.E. Soil solarization: historical perspectives, principles, and uses. In: Katan, J. & Devay, J.E. (Eds.) *Soil solarization*. Boca Raton. CRC Press. 1991. pp. 103-129.
- Konzen, E.A. Fertilização de lavoura e pastagem com dejetos de suínos e cama de aves. *Anais, V. Seminário Técnico da Cultura de Milho*, Videira. 2003.
- Lazarovits, G. Management of soil-borne plant pathogens with organic soil amendments: a disease control strategy salvaged from the past. *Canadian Journal of Plant Pathology* 23: 1-7. 2001.
- Lumsden, R.D.; Millner, P.D. & Lewis, J.A. Suppression of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* with composted sewage sludge. *Plant Disease* 70:197-201. 1986.
- Marschner, H. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. New York. Academic Press. 1986.
- Martin, F. N. & Hancock, J. G. Association of chemical and biological factors in soils suppressive to *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 76: 1221-1231. 1986.
- Millner, P.D.; Lumsden, R.D. & Lewis, J.A. Controlling plant disease with sludge compost. *Biocycle* 23: 50-52. 1982.
- Pavan, M.A. & Miyazawa, M. *Análise Química do Solo: Parâmetros para interpretação*. Londrina. IAPAR. Circular 91. 1996.
- Qian, P. & Johnson, L.F. Chemical and physical soil characteristics related to lysis of oospores of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 77: 1062-1066. 1987.
- Robbs, C. F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: Bettiol, W. *Controle Biológico de Doenças de Plantas*. Jaguariúna. EMBRAPA/CNPDA. 1991. pp. 121-133.
- Santos, I. dos & Bettiol, W. Efeito do lodo de esgoto no crescimento micelial de fitopatógenos habitantes do solo e na podridão do colo de plântulas de feijoeiro causados por *Sclerotium rofsii*, em condições controladas. *Ecossistema* 26: 157-161. 2001.
- Santos, I. dos & Bettiol, W. Effect of sewage sludge on the rot and seedling damping-off of bean plants caused by *Sclerotium rofsii*. *Crop Protection* 22: 1093-1097. 2003.
- Schoonhoven, A. van. & Pastor-Corrales, M.A. *Standard System for the Evaluation of Bean Germplasm*. Cali. CIAT. 1987.
- Smith, A.M. Ethylene as a cause of soil fungistasis. *Nature* 246: 311-313. 1973.
- Souza, N. L. & Bueno, C. J. Sobrevivência de clamidosporos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 2 e escleródios de *Sclerotium rofsii* em solo solarizado incorporado com matéria orgânica. *Summa Phytopathologica* 29: 153-160. 2003.

- Sousa, N. L. Solarização do solo. Summa Phytopathologica 20: 3-15. 1994.
- Taiz, L. & Zeiger, E. Fisiologia Vegetal. 3.ed. Porto Alegre. Artmed. 2004.
- Tenuta, M. & Lazarovits, G. Ammonia and nitrous acid from nitrogenous amendments kill the microesclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 92: 255-264. 2002.
- Tenuta, M.; Conn, K. L. & Lazarovits, G. Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. Phytopathology 92: 548-552. 2002.
- Tirelli, L. A.; Sangaletti, E. & Santos, I. Efeito de solo submetido à criação de suínos ao ar livre sobre as doenças do pepino causadas por *Pythium aphanidermatum*. Anais, Evento Científico SAEPE/JICC, Pato Branco. 2003. pp.189-192.
- Zambolim, L. & Ventura, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. Revisão Anual de Patologia de Plantas 1: 275-318. 1993.

## Capítulo 14

# Controle da Podridão de Raiz e Promoção de Crescimento em Hidroponia com Bactérias

Élida Barbosa Corrêa<sup>1</sup> & Wagner Bettiol<sup>2</sup>

<sup>1</sup>FCA/Unesp, 18610-307, Botucatu, SP, Brasil, e-mail: elidabcorrea@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Embrapa Meio Ambiente. CP 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil,  
e-mail: bettiol@cnpmembrapa.br. Bolsista do CNPq.

## Introdução

O desenvolvimento da agricultura por meio da criação e do aprimoramento das diversas formas de cultivo é um processo crescente e mundial, devido às necessidades de abastecimento de alimentos e aos vários nichos de mercado. Em 1930, substituiu-se o solo por solução nutritiva, composta por macro e micronutrientes, onde um dos objetivos da nova técnica de cultivo, denominada hidroponia, era evitar doenças causadas por patógenos veiculados ao solo (Zinnen, 1988; Stanghellini & Rasmussen, 1994).

O cultivo hidropônico, principalmente de hortaliças, está se desenvolvendo rapidamente como forma de produção vegetal (Furlani, 2008). A razão para tal aumento são as vantagens proporcionadas por esse tipo de cultivo, como a padronização da produção, a antecipação do ciclo da cultura, a redução no uso da água, a eficiência do uso de fertilizantes, a maior produção por área, a melhor qualidade dos produtos colhidos, a maior ergonomia no trabalho, a maior possibilidade de mecanização e a automatização da produção (Furlani *et al.*, 1999; Furlani, 2008). A principal cultura cultivada em hidroponia no Brasil é a alface. No entanto, outras culturas também são produzidas por esse sistema, em caráter comercial ou experimental, como a rúcula, o agrião, o almeirão, a couve em folhas, o coentro, a salsinha, a cebolinha, o salsaão, o tomate, o pepino, o pimentão, o morango, a batata e as plantas ornamentais (Faquin & Furlani, 1999; Moraes & Furlani, 1999; Chatterton *et al.*, 2004; Paulitz *et al.*, 1992; Medeiros *et al.*, 2002). O principal sistema hidropônico empregado no Brasil, para o cultivo de hortaliças folhosas, é o “nutrient film technique” (NFT), que consiste na circulação de uma fina lâmina de solução nutritiva nos canais de cultivo entre das raízes (Faquin & Furlani, 1999; Furlani, 2008).

Apesar do intuito de se evitar as doenças causadas por patógenos veiculados pelo solo, esses são um grande problema em hidroponia. Patógenos zoospóricos são listados como os mais destrutivos organismos em cultivos hidropônicos (Stanghellini & Rasmussen, 1994). As principais doenças que ocorrem em hidroponia são as podridões radiculares causadas por espécies de *Pythium* (Bates & Stanghellini, 1984; Stanghellini & Rasmussen, 1994; Utkhede *et al.*, 2000; Severino *et al.*, 2005). As razões para que essas sejam as doenças mais importantes nos cultivos hidropônicos, em todo o mundo, estão relacionadas aos fatores ambientais e biológicos das próprias espécies cultivadas. A temperatura e a umidade constantes favorecem a multiplicação do patógeno. As espécies cultivadas em hidroponia não possuem resistência genética à doença, sendo todas moderadamente ou altamente suscetíveis, aliado ao fato de serem cultivadas em elevada densidade. Fatores biológicos importantes no desenvolvimento da doença são a adaptação do patógeno ao ambiente aquático e a baixa diversidade biológica do sistema. No ambiente aquático *Pythium* spp. produz zoósporos, esporos flagelados, altamente eficientes na infecção do hospedeiro, que além de serem transportados pela solução nutritiva, são atraídos pelos exsudados radiculares. A baixa diversidade biológica no ambiente hidropônico, quando comparada ao solo, favorece a ocorrência de epidemias, pois ocorre pouca competição entre *Pythium* e os microrganismos nativos, favorecendo o estabelecimento do patógeno (Stanghellini & Rasmussen, 1994; Sutton *et al.*, 2006).

O controle da podridão de raiz em hidroponia é oneroso e difícil, pois para a eficiente eliminação do patógeno no sistema é necessária a paralisação da produção e a desinfestação de todo o sistema, condição essa não desejada pelo produtor. O controle deve ser preventivo por meio da utilização de mudas sadias e de água isenta de patógenos, pois essas são as principais fontes de inóculo. No entanto, o patógeno também pode ser introduzido no sistema por meio de solo contaminado aderido a ferramentas e a calçados, por substratos contaminados e por insetos (Tu *et al.*, 1999; Owen-Going *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 1997; Favrin *et al.*, 1988; Goldberg & Stanghellini, 1990; Sutton *et al.*, 2006). O controle químico da doença não é recomendado devido à contaminação do ambiente e das plantas, além da possibilidade de seleção de isolados do patógeno resistentes aos fungicidas (Yang *et al.*, 2004; Stanghellini & Rasmussen, 1994; Nelson, 1998). No Brasil, não existem fungicidas registrados para o controle da doença em hidroponia. Devido a colheita ser realizada diariamente, a utilização de agrotóxicos representa um alto risco de contaminação do produtor e do consumidor, pois na maioria dos cultivos comerciais as plantas de diferentes fases são abastecidas pela mesma solução nutritiva. Outro fator negativo quanto a utilização de agrotóxicos em hidroponia é a possibilidade de ocorrência de fitotoxidez, como observada por Utkhede *et al.* (2000) que ao utilizarem fosetyl-Al e metalaxyl para o controle da podridão de raiz em alface, causada por *Pythium aphanidermatum*, verificaram fitotoxidez nas plantas e o conseqüente agravamento do problema. A desinfestação da solução nutritiva com radiação UV (Sutton *et al.*, 2000), a filtragem (Goldberg *et al.*, 1992) e a elevação da temperatura da solução nutritiva (Tanaka *et al.*, 2003) podem ser utilizadas como medidas para diminuir o inóculo do patógeno no sistema. Entretanto, não afetam a população do patógeno na zona radicular, não tendo se mostrado como medidas eficientes (Khan *et al.*, 2003).

A manipulação pelo homem de processos biológicos que ocorrem naturalmente como o antagonismo entre os microrganismos, a promoção de crescimento de plantas e a indução de resistência são práticas promissoras de controle da doença. Vários autores demonstraram que é possível controlar biologicamente a podridão de raiz em hidroponia (Bochow, 1992; Sutton *et al.*, 2006; Paulitz *et al.*, 1992; Zheng *et al.*, 2000; Postma *et al.* 2000; Khan *et al.*, 2003; Chatterton *et al.*, 2004; Nemeč *et al.*, 1996; Corrêa *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Determinadas características do cultivo hidropônico que favorecem o patógeno, como a baixa diversidade biológica e as condições constantes de temperatura e umidade, também favorecem o estabelecimento de agentes de controle biológico nesse sistema. A baixa diversidade biológica possibilita a colonização do sistema radicular pelo agente de biocontrole sem competição com os microrganismos nativos. As condições ambientes constantes favorecem o seu estabelecimento e a sua multiplicação. É importante salientar que ambos os microrganismos, patógeno e agente de biocontrole, competem pelos exsudados radiculares, que são as principais fontes de nutrientes orgânicos no sistema (Sutton *et al.*, 2006).

Dentre os diferentes grupos de microrganismos, as bactérias são consideradas como promissores agentes de biocontrole da doença e promotores de crescimento de plantas em hidroponia (Bochow, 1992; Boehme *et al.*, 2005; Chatterton *et al.*, 2004; García *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Ongena *et al.*, 1999; Paulitz *et al.*, 1992; Utkhede *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Zhou & Paulitz, 1993). Existem no mercado internacional bioprodutos formulados com bactérias, principalmente as Gram (+), devido à maior facilidade de formulação, para o controle da podridão de raiz e a promoção de crescimento em hidroponia, como o Mycostop® (Kemira Agro Oy, Helsinki, Finlândia) formulado com *Streptomyces griseoviridis* para o controle da podridão de raiz (Yang *et al.*, 2004); Companionâ® (Growth Products, White Plains, New York, EUA) formulado com *Bacillus* spp. e comercializado como promotor de crescimento (Hydroasis, 2008) e Serenade® (AgraQuest Inc., Davis, Ca, EUA) formulado com *Bacillus subtilis* (isolado QST 713) para o controle da doença (Serenade, 2007). Corrêa *et al.* (2009) discutem amplamente o controle biológico de doenças em sistemas hidropônicos.

## **Bactérias como Agentes de Controle Biológico da Podridão de Raiz**

Bactérias são habitantes naturais dos ecossistemas e agroecossistemas terrestres e aquáticos e desempenham papel importantíssimo no equilíbrio biológico desses sistemas (Neves & Rumjanek, 1998; Melo, 1998; Corrêa *et al.*, 2009; Paulitz *et al.*, 1992). Neves & Rumjanek (1998) discutem a importância das bactérias diazotróficas nos solos tropicais. Melo (1998) descreve os mecanismos das bactérias promotoras de crescimento e seu potencial de uso na agricultura. Paulitz *et al.* (1992) controlaram a podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum* em pepino hidropônico aplicando *Pseudomonas* sp. isolada da mesma espécie hospedeira na solução nutritiva. Corrêa & Bettioli (2008) isolaram da rizosfera de plantas de manguezal diferentes espécies de *Bacillus* potenciais no controle da podridão de raiz em hidroponia.



A capacidade de controle de doenças de plantas por bactérias é proporcionada por diferentes mecanismos de ação, que podem atuar isoladamente ou em conjunto. Os principais mecanismos são a produção de compostos tóxicos aos patógenos, como enzimas hidrolíticas, biossurfactantes e antibióticos, denominado antibiose; a competição por espaço e nutrientes; a ativação de mecanismos de resistência latentes das plantas, denominado indução de resistência; a produção de compostos com elevada afinidade com o ferro denominados sideróforos, que tornam esse elemento indisponível aos patógenos em condições ambientes de baixa disponibilidade do elemento e a promoção de crescimento, discutida no próximo item (Chatterton *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2000; Zhou & Paulitz, 1993; Stanghellini & Miller, 1997; Kloepper *et al.*, 1988; Paulitz *et al.*, 1992).

O sucesso da utilização de bactérias como agentes de controle biológico da podridão de raiz em hidroponia é devido à capacidade de adaptação ao ambiente hidropônico e à colonização das raízes das plantas. A colonização das raízes pode proporcionar benefícios diretos para as plantas como a produção de hormônios de crescimento e/ou indiretos, como a exclusão de patógenos devido à ocupação do nicho de atuação. Tu *et al.* (1999) estudaram a relação entre a podridão de raiz causada por *Pythium* e a população de microrganismos em cultivo hidropônico de tomate, empregando lã de rocha como substrato para a sustentação das plantas, em sistemas com circulação contínua ou sem circulação da solução nutritiva. Os autores verificaram que a elevada população de bactérias no sistema com circulação contínua da solução nutritiva suprimiu a podridão de raiz causada por *Pythium*. Yang *et al.* (2004) verificaram que a adição de *Paenibacillus polymyxa* PKB1, isolado de canola, na concentração de  $1 \times 10^6$  e  $1 \times 10^8$  esporos/ml, na solução nutritiva do cultivo hidropônico de pepino, controlou a podridão de raiz causada por *Pythium* e promoveu o crescimento das plantas. A bactéria se estabeleceu no ambiente hidropônico, colonizando as raízes das plantas e a lã de rocha utilizada como substrato. A produção das plantas tratadas com a bactéria foi significativamente maior do que a testemunha inoculada ou não com *Pythium*. A aplicação dos isolados de *Pseudomonas chlororaphis* (Tx-1 e 63-28) e de *Bacillus cereus* (HY06), na concentração de  $10^4$  UFC/ml, em solução nutritiva de cultivo de crisântemo, 14 dias antes da inoculação com *Pythium aphanidermatum* ou *Pythium dissotocum*, protegeu as plantas da podridão de raiz causada pelos respectivos patógenos, independentemente da temperatura da solução nutritiva ser alta (32 °C) ou moderada (24 °C) (Liu *et al.*, 2007). Pagliaccia *et al.* (2007) modificaram o ambiente hidropônico radicular por meio da adição dos produtos N-Serve® e Truban® e controlaram a podridão de raiz causada por *Phytophthora capsici* em pimentão e *Pythium aphanidermatum* em pepino. De acordo com os autores, a capacidade de biocontrole dos produtos foi direta, por meio da ação antifúngica do ingrediente ativo dos produtos e indireta, por meio do aumento da população de *Pseudomonas* spp. na solução nutritiva, aumento proporcionado pelo ingrediente inerte do produto.

Predominância do mecanismo de indução de resistência sobre a produção de sideróforos e antibióticos foi verificada na proteção de pepino hidropônico contra a podridão de raiz causada por *Pythium aphanidermatum*, por meio da adição de isolados de *Pseudomonas putida* na solução nutritiva (Ongena *et al.*, 1999). Raízes de pepino tratadas com os isolados de *Pseudomonas putida* BTP1 e seu mutante deficiente na produção de sideróforos tiveram a mesma severidade da doença e não foram

encontrados sideróforos (pioverdinas) na solução nutritiva. A produção de compostos tóxicos por esses isolados não foi verificada por meio do pareamento dos isolados bacterianos com o patógeno em meio de cultura, não havendo inibição do crescimento micelial do patógeno. No entanto, nos tratamentos com os isolados foi observada elevada quantidade de compostos fenólicos na solução nutritiva, em comparação com os outros tratamentos, sendo que determinados compostos fenólicos podem induzir resistência nas plantas. Esses resultados sugerem que compostos fenólicos antifúngicos, induzidos pela inoculação com os isolados bacterianos participaram ativamente na proteção das plantas contra *Pythium aphanidermatum*.

## Bactérias como Promotoras de Crescimento de Plantas em Hidroponia

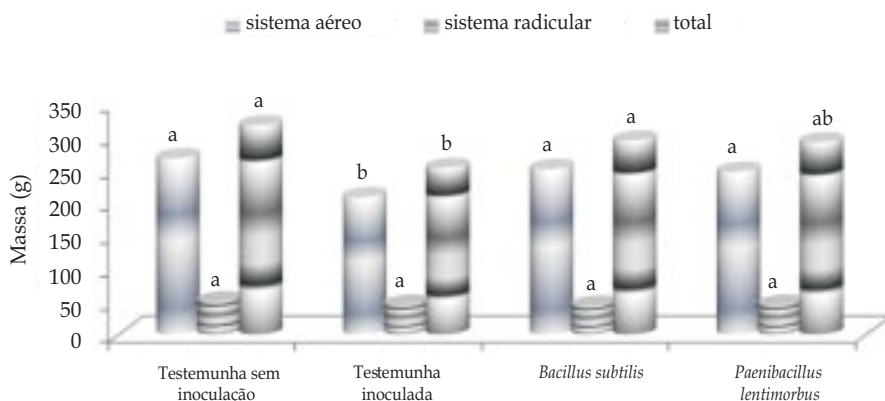
A promoção de crescimento de plantas em hidroponia por meio da adição de microrganismos no sistema de cultivo é uma alternativa para acelerar o retorno financeiro e a recuperação dos custos de implantação do sistema hidropônico, assim como para racionalizar o uso de fertilizantes. A promoção de crescimento das plantas mediada por microrganismos pode ser realizada por mecanismos diretos, como a produção de fitohormônios estimuladores do crescimento (Datta *et al.*, 1982), mobilização do fósforo (De Freitas *et al.*, 1997; Datta *et al.*, 1982) ou por mecanismos indiretos, relacionados à eliminação de microrganismos prejudiciais às plantas por meio da produção de sideróforos (Kloepper *et al.*, 1988; Harman *et al.*, 2004), produção de antibióticos (Harman *et al.*, 2004; Luz, 1996), indução de resistência das plantas contra fitopatógenos (Ramamoorthy *et al.*, 2001), eliminação dos microrganismos deletérios e de seus metabólitos tóxicos presentes na zona radicular (Harman *et al.*, 2004) e por proporcionar maior absorção de nutrientes pelas raízes das plantas.

Exemplos de promoção de crescimento e de aumento de produtividade utilizando bactérias em cultivo hidropônico são relatados por Paulitz *et al.* (1992), García *et al.* (2004), Yang *et al.* (2004), McCullagh *et al.* (1996) e Van Peer & Schippers (1988). Paulitz *et al.* (1992) verificaram que, em pepino hidropônico, a aplicação de *Pseudomonas* spp. na solução nutritiva de cultivo, na ausência do patógeno, promoveu o desenvolvimento do sistema radicular em 134%. Também em pepino, Yang *et al.* (2004) verificaram que o isolado PKB1 de *Paenibacillus polymyxa*, aplicado na solução nutritiva de cultivo, aumentou a produtividade das plantas. O isolado de *Pseudomonas fluorescens* (63-49) promoveu o crescimento de plantas de pepino hidropônico e aumentou a sua produtividade na presença ou na ausência de *Pythium aphanidermatum*. Na ausência do patógeno o isolado bacteriano aumentou o número de frutos em 12% e a massa das plantas em 18%. Em plantas inoculadas com *Pythium aphanidermatum* o aumento na produção de frutos foi de 18% (McCullagh *et al.*, 1996). Em tomate hidropônico, Van Peer & Schippers (1988) verificaram que a aplicação de *Pseudomonas* spp. promoveram o crescimento das plantas, aumentando a massa do sistema aéreo e radicular. García *et al.* (2004) verificaram que a adição de suspensões de 10<sup>8</sup> células/ml de *Bacillus licheniformis* por planta em sistema hidropônico proporcionou aumento na produtividade e no diâmetro dos frutos de tomate.

## Controle Biológico da Podridão de Raiz Causada por *Pythium aphanidermatum* com Bactérias

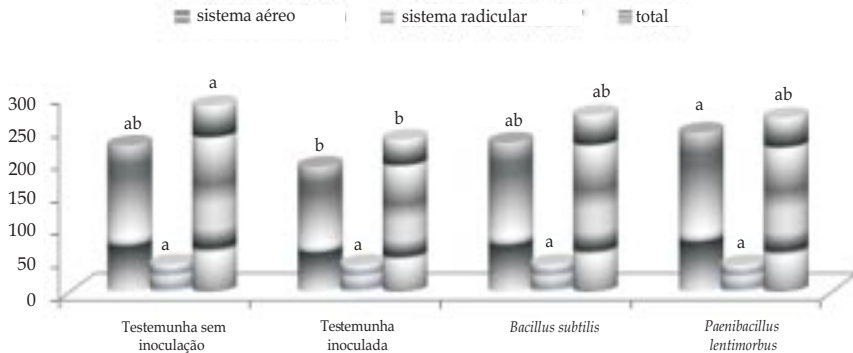
Dois isolados bacterianos de *Bacillus subtilis* (AP-3) e *Paenibacillus lentimorbus* (OG), agentes de controle biológico da brusone do arroz (Bettiol, 1988) e da podridão de raiz causada por *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* em plantas de limão 'Cravo' (Amorim & Melo, 2002), respectivamente, foram testados quanto à capacidade de controlar a podridão de raiz em plantas de alface 'Vera' cultivadas em hidroponia, no sistema de fluxo laminar de nutrientes. O controle da doença foi avaliado adicionando-se nos tanques de solução nutritiva o meio de cultura (0,5% de milhocina + 0,5% de melaço + 0,3% de fosfato monobásico) na concentração de 1%, fermentado ou não pelas bactérias, dois dias antes e quatro dias após a inoculação das plantas com o patógeno. As plantas foram inoculadas artificialmente e naturalmente. A artificial foi realizada mergulhando-se as raízes das plantas em uma suspensão de  $1 \times 10^4$  zoósporos/ml por 30 min. e a natural foi realizada por meio da disseminação do patógeno a partir das plantas inoculadas artificialmente para as plantas sadias na linha de cultivo. O delineamento foi em blocos casualizados, com duas repetições compostas de 20 plantas cada repetição. No final do experimento foram avaliadas as massas das plantas e a incidência do patógeno nas raízes.

*Paenibacillus lentimorbus* e *Bacillus subtilis* diminuíram a incidência do patógeno nas raízes das plantas inoculadas artificialmente em 67% e 17%, respectivamente. Nas plantas naturalmente inoculadas a diminuição foi de 100% e 60%, respectivamente. As plantas apenas inoculadas com o patógeno (testemunha inoculada) apresentaram o menor desenvolvimento, quando comparadas com as dos demais tratamentos (Figura 1).



**Figura 1.** Efeito de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus* na massa fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico, e inoculadas artificialmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey 5%).

Os tratamentos com as bactérias proporcionaram maior desenvolvimento da parte aérea das plantas inoculadas artificialmente e o com *Bacillus subtilis* proporcionou maior desenvolvimento da massa total das plantas (Figura 1). A aplicação do meio fermentado por *Paenibacillus lentimorbus* proporcionou o maior desenvolvimento da massa fresca da parte aérea das plantas inoculadas naturalmente (Figura 2). A proteção das plantas quanto ao subdesenvolvimento proporcionado pela infecção por *Pythium* spp. também foi verificada com a aplicação de *Bacillus subtilis* (BACT-0) (Utkhede *et al.*, 2000) e *Bacillus cereus* (HY06) (Liu *et al.*, 2007).



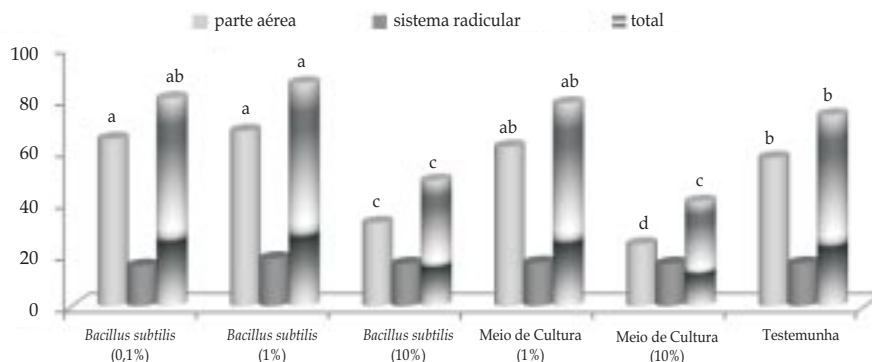
**Figura 2.** Efeito de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus* na massa fresca de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico e inoculadas naturalmente com *Pythium aphanidermatum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente (Tukey 5%).

## Promoção de Crescimento das Plantas por *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus*

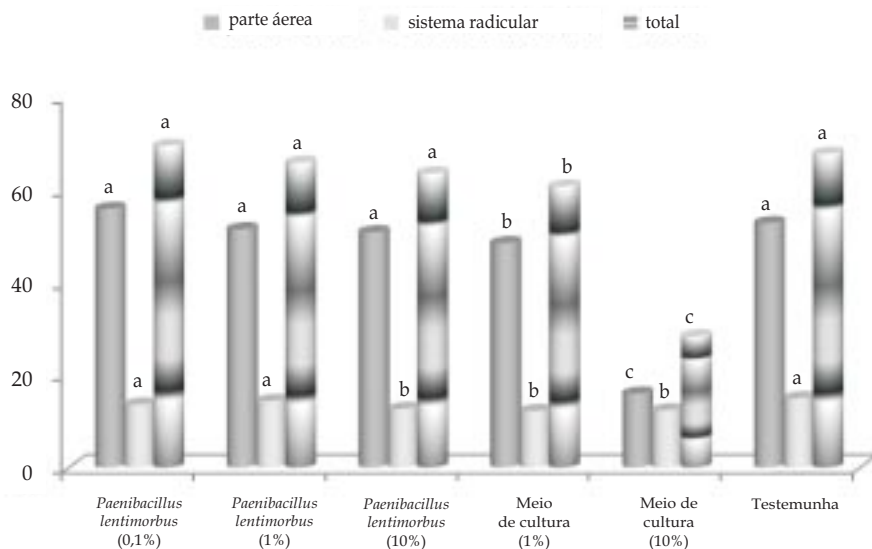
A avaliação da promoção de crescimento de plantas de alface hidropônica cultivar 'Vera' foi realizada no sistema de fluxo laminar de nutrientes adicionando-se meio de cultura (0,5% de milhocina + 0,5% de melão + 0,3% de fosfato monobásico) fermentado por *Bacillus subtilis* (AP-3) ou *Paenibacillus lentimorbus* (OG), nas concentrações de 0,1%; 1% e 10%. Além desses tratamentos, foram estudados os efeitos das concentrações de 1% e 10% do meio de cultura não fermentado pelas bactérias nos tanques de solução nutritiva. O meio de cultura fermentado ou não foi acrescido na solução nutritiva após 24 horas da transferência das plantas para o sistema definitivo. Após 22 dias da transferência das plantas realizou-se a avaliação determinando-se a massa das plantas. A aplicação do meio fermentado ou não por *Bacillus subtilis* na concentração de 10% reduziu significativamente o desenvolvimento (Figura 3). Por outro lado, nas menores concentrações estimulou o desenvolvimento das plantas (Figura 3). A capacidade de isolados de *Bacillus* promoverem o crescimento das plantas em hidroponia também foi demonstrada por García *et al.* (2004) e Boehme *et al.* (2005). García *et al.* (2004) verificaram que a inoculação de tomate e pepino com *Bacillus licheniformis* incrementou o crescimento das plantas em sementeiras e proporcionou maior produtividade em condições comerciais de cultivo, incluindo o cultivo hidropônico.

Os autores consideram que a produção de hormônios de crescimento como giberelinas pela bactéria foi o mecanismo de ação envolvido. Resultados semelhantes foram observados por Boehme *et al.* (2005) com *Bacillus subtilis* aplicados nas folhas e raízes de pepino desenvolvido em sistema hidropônico com ganhos significativos na produção, sendo a aplicação da bactéria nas raízes mais eficiente.

No ensaio com *Paenibacillus lentimorbus*, a aplicação do meio de cultura na concentração de 10% também causou fitotoxicidade nas plantas, diminuindo o seu desenvolvimento (Figura 4). Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente da testemunha (Figura 4).



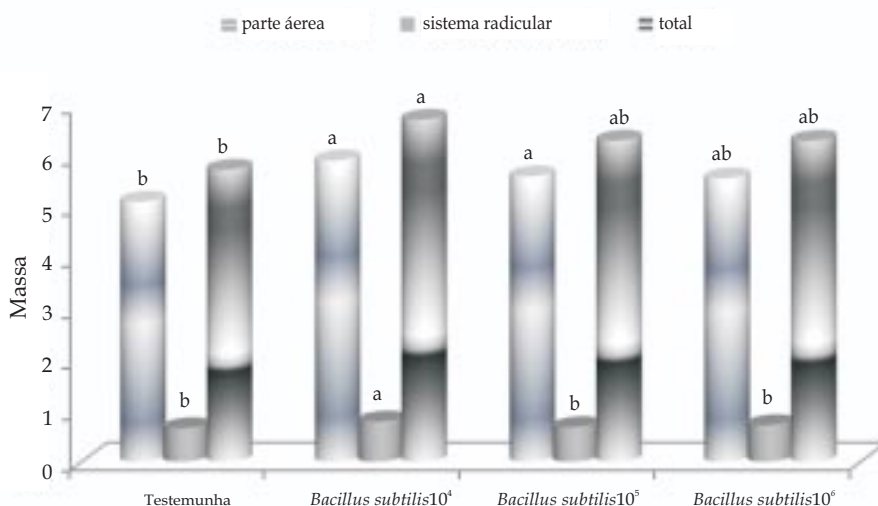
**Figura 3.** Efeito da aplicação de meio de cultura fermentado ou não por *Bacillus subtilis* na massa fresca (g) de plantas de alface cultivadas em hidroponia. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%). Dados sem letra não foram significativos no teste F.



**Figura 4.** Efeito da aplicação de meio de cultura fermentado ou não por *Paenibacillus lentimorbus* na massa fresca (g) de plantas de alface cultivadas em hidroponia. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

Após a avaliação da capacidade do meio fermentado por *Bacillus subtilis* (AP-3) promover o crescimento das plantas avaliou-se a capacidade de células da bactéria em promover o crescimento das plantas cultivadas em hidroponia. Assim, foram adicionadas células nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$ /ml de solução nutritiva de cultivo de alface hidropônica, 24 h após a transferência das plantas para o sistema definitivo (NFT).

O tratamento testemunha não recebeu as células da bactéria. A multiplicação de *Bacillus subtilis* foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar, por dois dias a  $25 \pm 2$  °C sob luz constante. Após 14 dias da transferência das plantas para o sistema definitivo avaliou-se as massas secas das plantas. O delineamento experimental foi em dois blocos casualizados com quatro tratamentos, e cada parcela experimental foi constituída por 20 plantas. A aplicação de células de *Bacillus subtilis* na solução nutritiva causou efeito positivo no desenvolvimento das plantas, sendo que a concentração de  $10^4$  células/ml foi a melhor, incrementando a massa da parte aérea das plantas em 17% (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito da aplicação de células de *Bacillus subtilis* na massa seca (g) de plantas de alface cultivadas em hidroponia. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

Os resultados encontrados tanto nos ensaios de controle biológico da podridão de raiz (*Pythium aphanidermatum*) como de promoção de crescimento em plantas de alface cultivadas em hidroponia com as bactérias Gram (+) demonstraram a potencialidade de utilização de *Paenibacillus lentimorbus* como agente de controle biológico da doença e de *Bacillus subtilis* como agente de controle biológico e promotor de desenvolvimento das plantas.

## Considerações Finais

O controle da podridão de raiz em hidroponia deve enfatizar a planta e a microbiota benéfica que interagem no ambiente hidropônico. Maior atenção deve ser dada à manipulação do ambiente para tornar a planta menos suscetível às podridões radiculares. Esse tipo de manipulação pode ser realizado pelo aumento da oxigenação da solução nutritiva, principalmente nas horas mais quentes do dia; manutenção da solução nutritiva com a condutividade elétrica (CE) adequada para a cultura; eliminação das algas do sistema hidropônico, pois essas podem liberar compostos tóxicos e sequestrarem os nutrientes da cultura e a adoção de medidas que evitem a ocorrência de elevadas temperaturas na solução nutritiva durante o cultivo (Borowitzka, 1995; Sutton *et al.*, 2006). A eliminação das plantas mortas e com murcha do sistema é uma medida importante de sanitização para a diminuição do inóculo no sistema. O aumento da população microbiana, natural ou introduzida, no ambiente hidropônico, pode ser realizado por meio da adição de determinados compostos na solução nutritiva. Por exemplo, Pagliaccia *et al.* (2007) controlaram a podridão de raiz em pepino e pimentão adicionando na solução nutritiva compostos que estimulavam a população de *Pseudomonas*. Stanghellini & Miller (1997) controlaram a podridão de raiz causada por *Phytophthora capsici* em pimentão adicionando óleo de oliva na solução nutritiva. Segundo os autores o óleo fornecia substrato para a produção de biossurfactantes por *Pseudomonas*, que são substâncias de superfície ativa que se ligam à membrana plasmática do zoósporo, causando a sua lise.

Se o frágil estabelecimento e sobrevivência de linhagens capazes de controlarem doenças de plantas e promoverem o seu crescimento constituem um entrave à utilização de bactérias no solo, a sua utilização em hidroponia é ainda mais crítica, devido à maioria dos isolados estudados para o controle de doenças em hidroponia serem originários do solo, o que diminui sua possibilidade de estabelecimento no ambiente aquático (Khan *et al.*, 2003; Corrêa *et al.*, 2005; Pagliaccia *et al.*, 2007). De acordo com Pagliaccia *et al.* (2007), a ineficiência do controle biológico em hidroponia é muitas vezes relacionada à não manutenção da população dos agentes de controle biológico em um nível adequado para suprimir a população do patógeno. É, portanto, fundamental realizar a prospecção de agentes de biocontrole para podridões radiculares em hidroponia nos próprios ambientes hidropônicos ou em ambientes similares a este. Assim, a população do agente de biocontrole, quando introduzida, poderá se manter em níveis adequados para o controle da doença.

Estudos quanto à capacidade de biocontrole de doenças e promoção de crescimento de plantas com bactérias Gram (+) do gênero *Bacillus* *Paenibacillus* possuem vantagens relacionadas ao desenvolvimento de um produto comercial, quando comparado com bactérias Gram (-), que compreendem o gênero *Pseudomonas*. Essa vantagem é devido à produção de endósporos, esporos resistentes à dessecação e com maior capacidade de sobrevivência quando formulados com polímeros e inertes diversos (Melo, 1998). Como exemplo do maior número de bactérias Gram (+) utilizadas na agricultura pode-se citar o número de microrganismos registrados como biopesticidas na Environmental Protection Agency (EPA) de 1996 a 2008 nos Estados Unidos. Dentre

os isolados bacterianos listados existem 16 de *Bacillus thuringiensis*, dois de *Bacillus subtilis*, um de *Bacillus licheniformes*, um de *Bacillus cereus*, dois de *Bacillus pumilus*, um de *Streptomyces lydicus*, um de *Agrobacterium radiobacter*, um de *Pseudomonas chlororaphis*, um de *Pseudomonas aureofaciens* e dois de *Pantoea agglomerans* (EPA, 2009).

Desde que conhecidos os danos ocasionados pelo uso excessivo de agrotóxicos a sociedade vem cobrando por formas de cultivo que impactem menos o ambiente. Dentre as medidas alternativas de manejo de doenças de plantas o controle biológico pode ser utilizado como substituição ao químico ou para diminuir o seu uso, em cultivos no campo, em casa-de-vegetação e em hidroponia. Devido a essas questões, estudos que visem à seleção de agentes de biocontrole e/ou promotores de crescimento de plantas, bem como o desenvolvimento de técnicas para a implementação do uso desses microrganismos nas diversas formas de cultivo vegetal, vão ao encontro do desejo mundial de uma agricultura sustentável ao ambiente como um todo, incluindo o produtor, o consumidor e os organismos que interagem no agroecossistema.

## Referências

- Amorim, E. P. R. & Melo, I. S. Ação antagonica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. Revista Brasileira de Fruticultura 24: 1-7. 2002.
- Bates, M.L. & Stanghellini, M.E. Root rot hydroponically grown spinach caused by *Pythium aphanidermatum* and *Pythium dissotocum*. Plant Disease 68: 989-991. 1984.
- Bettiol, W. Seleção de microrganismos antagonicos a *Pyricularia oryzae* para o controle de brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Tese de Doutorado. Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1988.
- Bochow, H. Phytosanitary effects of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. International Symposium Over Fytofarmacien-Fytiatrie, 1992, Gent. 57: 387-393. 1992.
- Boehme, M.; Schevtschenko, J. & Pinker, I. Effect of biostimulators on growth of vegetables in hydroponical systems. Acta Horticulturae 697: 337-344. 2005.
- Borowitzka, M.A. Micro-algae as sources of pharmaceutical and other biologically active compounds. Journal of Applied Phycology 7: 3-15. 1995.
- Chatterton, S.; Sutton, J. C. & Boland, G.J. Timing *Pseudomonas chlororaphis* applications to control *Pythium aphanidermatum*, *Pythium dissotocum*, and root rot in hydroponic peppers. Biological Control 30: 360-373. 2004.
- Corrêa, E. B.; Bettiol, W. & Morandi, M. Controle Biológico da podridão de raízes induzida por *Pythium aphanidermatum* em plantas de alface em sistema hidropônico com *Clonostachys rosea*. Fitopatologia Brasileira 30: 91. 2005. (Resumo).
- Corrêa, E.B.; Bettiol, W.; Sutton, J.C. & Sopher, C.R. Controle biológico de doenças em cultivos hidropônicos. In: Melo, I.S. (Ed.) Controle biológico, v.4. No prelo. 2009.
- Datta, M.; Banik, S. & Gupta, K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. Plant and Soil 69: 365-373. 1982.
- De Freitas, J.R.; Banerjee, M.R. & Germida, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth na yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biology and Fertility of Soils 24: 358-364. 1997.
- EPA. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/>. Acesso em: 04 de janeiro de 2009.
- Faquin, V. & Furlani, P.R. Cultivo de hortaliças de folhas em hidroponia em ambiente protegido. Informe Agropecuário 20: 99-104. 1999.



- Favrin, R.J.; Rahe, J.E. & Mauza, B. *Pythium* spp. associated with crown rot of cucumber in British Columbia greenhouses. *Plant Disease* 72: 683-687. 1988.
- Furlani, P.R. Simpósio IV – *Pythium* em sistemas hidropônicos – danos e perspectivas para o controle: Principais sistemas hidropônicos em operação no Brasil. *Summa Phytopathologica* 34: 146-147. 2008.
- Furlani, P.R.; Bolonhezi, D.; Silveira, L.C.P. & Faquin, V. Nutrição mineral de hortaliças, preparo e manejo de soluções nutritivas. *Informe Agropecuário* 20: 90-98. 1999.
- García, L. J. A.; Probanza, A.; Ramos, B.; Palomino, M.R. & Mañero, F.J.G. Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper. *Agronomie* 24: 169-176. 2004.
- Goldberg, N.P. & Stanghellini, M.E. Ingestion-egestion and aerial transmission of *Pythium aphanidermatum* by shore flies (Ephydrinae: *Scatella stagnalis*). *Phytopathology* 90: 1244-1246. 1990.
- Goldberg, N.P.; Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.L. Filtration as a method of controlling *Pythium* root rot of hydroponically grown cucumbers. *Plant Disease* 76: 777-779. 1992.
- Harman, G.E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I. & Lorito, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews - Microbiology* 2: 43-55. 2004.
- Hydroasis. Disponível em: <http://www.hydroasis.com.br>. Acesso em: 03 de maio de 2008.
- Khan, A.; Sutton, J.C. & Grodzinski, B. Effects of *Pseudomonas chlororaphis* and root rot in peppers grown in small-scale hydroponic troughs. *Biocontrol Science and Technology* 13: 615-630. 2003.
- Kloepper, J.W.; Lifshitz, R. & Schroth, M.N. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *Animal and Plant Sciences* 60: 64. 1988.
- Liu, W.; Sutton, J.C.; Grodzinski, B.; Kloepper, J.W. & Reddy, M.S. Biological control of *Pythium* root rot of chrysanthemum in small-scale hydroponic units. *Phytoparasitica* 35: 159-178. 2007.
- Luz, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4: 1-49. 1996.
- McCullagh, M.; Utkhede, R.; Menzies, J.G.; Punja, Z.K. & Paulitz, T.C. Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield. *European Journal of Plant Pathology* 102: 747-755. 1996.
- Medeiros, C.A.B.; Ziemer, A.H.; Daniels, J. & Pereira, A.S. Produção de sementes pré-básicas de batata em sistemas hidropônicos. *Horticultura Brasileira* 20: 110-114. 2002.
- Melo, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. de. *Ecologia Microbiana. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente*. 1998. pp. 87-116.
- Moraes, C.A.G. & Furlani, P.R. Cultivo de hortaliças de frutos em hidroponia em ambiente protegido. *Informe Agropecuário* 20: 105-113. 1999.
- Nelson, P. V. *Greenhouse Operation and Management*. 5<sup>th</sup> Ed. Upper Saddle River. Prentice-Hall. 1998.
- Nemec, S.; Datnoff, L.E. & Strandberg, J. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection* 15: 735-742. 1996.
- Neves, M.C.P. & Rumjanek, N.G. Ecologia das bactérias dizotróficas nos solos tropicais. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. de. *Ecologia microbiana. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente*. 1998. pp. 15-60.
- Ongena, M.A.; Daayf, F.B.; Jacques, P.A.; Thonart, P.A.; Benhamou, N.D.; Paulitz, T.C.E.; Cornelis, P.F.; Koedam, N.G. & Belanger, R.R.C. Protection of cucumber against *Pythium* root rot by fluorescent pseudomonads: predominant role of induced resistance over siderophores and antibiosis. *Plant Pathology* 48: 66-76. 1999.
- Owen-Going, N.; Sutton, J.C. & Grodzinski, B. Relationships of *Pythium* isolates and sweet pepper plants in single-plant hydroponic units. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 155-167. 2003.
- Pagliaccia, D.; Ferrin, D. & Stanghellini, M.E. Chemo-biological suppression of root-infecting zoosporic pathogens in recirculating hydroponic systems. *Plant and Soil* 299: 163-179. 2007.
- Paulitz, T.C.; Zhou, T. & Rankin, L. Selection of rhizosphere bacteria for biological control of *Pythium aphanidermatum* on hydroponically-grown cucumber. *Biological Control* 2: 226-237. 1992.

- Postma, J.; Willemsen-De Klein, M.E.I.M. & Van Elsas, J.D. Effect of the indigenous microflora on the development of root and crown rot caused by *Pythium aphanidermatum* in cucumber grown on rockwool. *Phytopathology* 90: 125-133. 2000.
- Ramamoorthy, V.; Viswanathan, R.; Raguchander, T.; Prakasan, V. & Samiyappan, R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection* 20: 1-11. 2001.
- Rey, P.; Nodet, P. & Tirilly, Y. *Pythium* F induces a minor but ubiquitous disease in tomato soilless cultures. *Journal of Plant Pathology* 79: 173-180. 1997.
- Serenade. Disponível em: <http://www.agraquest.com/products/serenade/index.html#formulations>. Acesso em: 15 de março de 2007.
- Severino, J.J.; Caixeta, M.P.; Aguiar, R.L.; Tessmann, D.J.; Versignassi, J.R. & Vida, J.B. Podridão de *Pythium* sp. causando severos danos em alface hidropônica. *Fitopatologia Brasileira* 30: 141. 2005. (Resumo).
- Stanghellini, M.E. & Miller, R.M. Biosurfactantes: their identify and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. *Plant Disease* 81: 4-10. 1997.
- Stanghellini, M.E. & Rasmussen, S.L. Hydroponics a solution for zoosporic pathogens. *Plant Disease* 78: 1129-1138. 1994.
- Sutton J.C.; Yu, H.; Grodzinski, B. & Johnstone, M. Relationships of ultraviolet radiation dose and inactivation of pathogen propagules in water and hydroponic nutrient solution. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 300-309. 2000.
- Sutton, J.C.; Sopher, C.R.; Owen-Going, T.N.; Liu, W.; Grodzinski, B.; Hall, J.C. & Benchimol, R.L. Etiology and epidemiology of *Pythium* root rot in hydroponic crops: current knowledge and perspectives. *Summa Phytopathologica* 32: 307-321. 2006.
- Tanaka, M.A.S.; Ito, M. F.; Braga, C.A.S. & Armond, G. Tratamento térmico solar da água para controle de fitopatógenos. *Fitopatologia Brasileira* 28: 386-393. 2003.
- Tu, J.C.; Papadopoulos, X. & Zheng, J. The relationship of *Pythium* root rot and rhizosphere microorganisms in a closed circulating and an open system in rockwool culture of tomato. *Acta Horticulturae* 481: 577-583. 1999.
- Utkhede, R.S.; Lévesque, C.A. & Dinh, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its controls. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 138-144. 2000.
- van Peer, R. & Schippers, B. Plant growth responses to bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. *Canadian Journal of Microbiology* 35: 456-463. 1988.
- Yang, J.; Kharbanda, P.D. & Mirza, M. Evaluation of *Paenibacillus polymyxa* PKB1 for biocontrol of *Pythium* disease of cucumber in a hydroponic system. *Acta Horticulturae* 635: 59-66. 2004.
- Zheng, J.; Sutton, J.C. & Yu, H. Interactions among *Pythium aphanidermatum*, roots, root mucilage, and microbial agents in hydroponic cucumbers. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 368-379. 2000.
- Zhou, T. & Paulitz, T.C. *In vitro* and *in vivo* effects of *Pseudomonas* spp. on *Pythium aphanidermatum*: zoospore behavior in exudates and on the rhizoplane of bacteria-treated cucumber roots. *Phytopathology* 83: 872-876. 1993.
- Zinnen, T.M. Assessment of plant diseases in hydroponic culture. *Plant Disease* 72: 96-99. 1988.

## Capítulo 15

# Controle Biológico com *Trichoderma* em Grandes Culturas – Uma Visão Empresarial

Alan William Vilela Pomella<sup>1</sup> & Rute Terezinha da Silva Ribeiro<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biocontrole Farroupilha, Av. Cica 555, 38706-420, Patos de Minas, MG, Brasil, e-mail: alan@sementesfarroupilha.com.br; <sup>2</sup> Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia CP 1352, 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil.

## Introdução

O controle biológico é conhecido a cerca de 70 anos, porém somente na década de 1960 é que a teoria uniu-se à prática (Paulitz & Belanger, 2001). A eficiência de *Trichoderma* em controlar patógenos que ocasionam tombamento, como espécies de *Fusarium* e *Rhizoctonia*, foi demonstrada por Ahmad & Baker (1987) e Baker & Snyder (1965). Estss trabalhos ofereceram o embasamento técnico para dezenas de produtos comerciais à base de *Trichoderma* no mercado mundial.

*Trichoderma* spp. são fungos de vida livre, ubíquos e altamente interativos na raiz e solo, bem como no interior de plantas. São considerados saprófitos e têm despertado interesse científico e aplicado como agentes de controle biológico e produtores de enzimas para uso industrial.

Pesquisas recentes os sobre mecanismos de ação baseadas em técnicas de biologia molecular, além da competição, parasitismo e antibiose, comprovam a importante ação de metabólitos secundários produzidos pelo fungo na promoção de crescimento de plantas e na indução de resistência a patógenos (Harman *et al.*, 2004). Estas pesquisas têm produzido conhecimentos capazes de serem transformados rapidamente em benefícios práticos, incluindo genes que codificam enzimas degradadoras de parede celular, que podem ser utilizados para produzir plantas transgênicas resistentes às doenças (Distefano *et al.*, 2008).

A genética molecular e a bioquímica do biocontrole são bem definidas. No entanto, pouco é conhecido sobre os mecanismos de promoção de crescimento de plantas. Certas linhagens rizosfera-competentes são hábeis na promoção do crescimento de plantas, via colonização dos tecidos do sistema radicular, em condições naturais e axênicas (Whips, 1997) ou disponibilização de nutrientes para a planta (Altomare *et al.*, 1999). Estas descobertas auxiliaram no entendimento do papel de *Trichoderma* em ecossistemas naturais ou cultivados e promovem a sua utilização na agricultura. Todos os trabalhos realizados com isolados antagonistas de *Trichoderma* têm demonstrado a sua habilidade para controlar as doenças. No entanto, o nível de eficácia verificado em muitos dos trabalhos de campo é menor do que o esperado. Três fatores são importantes para a obtenção de resultados efetivos com os agentes de biocontrole: linhagens efetivas no campo contra diversos fitopatógenos, baixo custo de produção envolvendo as formulações eficientes e forma, dose e épocas de aplicação.

Produtos à base de *Trichoderma* são eficientes na redução da incidência de tombamento de plantas, diminuindo também a severidade de doenças ocasionadas por patógenos habitantes de solo, como *Fusarium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium* e *Sclerotinia*. Esses produtos podem ser utilizados para o tratamento de substrato e de sementes e pulverização na parte aérea das plantas. Os produtos à base de *Trichoderma* são encontrados no mercado nas formulações pó molhável (PM), grânulos dispersíveis em água (WG) e líquidas (esporos em suspensões oleosas ou aquosas). Para aumentar a vida de prateleira são acrescidos adjuvantes que protegem os propágulos.

Pelo fato dos produtos serem formulados com esporos vivos do fungo torna-se importante o armazenamento, o qual deve ser refrigerado ou em local com temperaturas, preferencialmente, inferiores a 28 °C. As aplicações devem ser feitas à tarde em condições de alta umidade relativa. Quando em cultivo protegido as exigências são menores, devido à menor incidência dos raios ultravioleta, que são prejudiciais ao fungo, e as condições mais favoráveis de umidade e temperatura. O nível tecnológico e cuidados requeridos para a utilização de produtos biológicos são maiores quando comparado com aqueles adotados para os produtos químicos.

Devido aos benefícios do controle biológico, percebe-se que o mercado busca formas mais seguras para utilizar estes produtos. Em 2007, no Brasil, cerca de 550 t de produtos à base de *Trichoderma* foram utilizadas, o que seria equivalente a uma área tratada de 600.000 ha de lavouras. Se for considerada somente a área de soja plantada no país (22 milhões de ha), observa-se que este mercado tem grande potencial de evolução.

## **Visão Empresarial do Uso de *Trichoderma***

Trabalhos de empresas privadas estão comprovando que a utilização do controle biológico para grandes culturas é um investimento tecnicamente viável e economicamente rentável. Um exemplo é o de uma empresa no estado de Minas Gerais que possui cerca de 17.000 ha, cultivados com algodão, soja, feijão e milho.

Por ser elevado o volume de agrotóxicos utilizados anualmente, onerando o custo de produção, e devido aos benefícios sócio-ambientais, a empresa decidiu investir no controle biológico. Convênios foram firmados com diversas instituições de pesquisas e ensino no Brasil e no exterior, os quais auxiliaram na seleção do isolado de *Trichoderma* a ser produzido e na construção, logística e manutenção da biofábrica. Atualmente, nessa empresa é produzido majoritariamente *Trichoderma asperellum*. O isolado tem comportamento endofítico, pois foi isolado do interior de uma árvore na mata atlântica. Em 2008, a biofábrica processou, em média, 1250 kg/dia de substrato, totalizando uma produção de 25.000 kg/mês. Toda a produção é consumida pela empresa. Porém, após obtenção de seu registro junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o objetivo é comercializar o produto,.

A busca pela melhoria na qualidade do produto é constante, tanto por meio de testes com novas formulações, como pela avaliação de métodos de aplicação. Ensaio são conduzidos objetivando aprimorar a sua recomendação, quanto a dosagem para as diferentes culturas, compatibilidade com agrotóxicos, intervalo e horário de aplicação. Os resultados obtidos no campo com a aplicação de *Trichoderma* são animadores, principalmente, para as culturas da soja, algodão e feijão. Nessa empresa foi abolido o tratamento fungicida de sementes, sendo substituído pelo *Trichoderma*. No tratamento de sementes são adicionados cerca de 10.000 esporos/semente. Uma manta de micélio ao redor da semente, fornecendo eficiente proteção contra o ataque de patógenos externos, é observada sob microscópio após a germinação dos esporos. Comprovou-se também que 90% das sementes de feijão infectadas por *Colletotrichum lindemuthianum*, após serem tratadas com o antagonista, não desenvolveram a doença após o plantio.

O sucesso do programa é creditado ao aumento do estande de plantas, devido à redução de tombamento ocasionado por patógenos de solo como *Fusarium* e *Rhizoctonia solani*, ao efeito fitotônico, que promove um maior vigor às plantas e também à sensível redução na incidência e na severidade de *Sclerotinia sclerotiorum*, o que permitiu reduzir a utilização de fungicidas químicos. Portanto, o custo de produção foi reduzido, tanto pelo aumento da produtividade, quanto pela diminuição na utilização de agrotóxicos. O diferencial expresso pelo produto biológico desenvolvido na empresa está na seleção de um isolado altamente eficiente e em toda a tecnologia empregada na sua formulação e aplicação.

Resultados obtidos na cultura da batata são surpreendentes na medida em que a utilização do *Trichoderma*, aplicado no sulco do plantio e no momento da amontoa, incrementou em mais de 20% a produtividade. Além disso, verificou-se melhoria na qualidade dos tubérculos pela redução de manchas ocasionadas pela rizoctoniose e sarna comum (*Streptomyces scabies*).

A adição de *Trichoderma* no substrato para a produção de mudas de eucalipto forneceu resultados animadores. O fungo promoveu maior desenvolvimento e melhor sanidade do sistema radicular das plantas, tornando-as mais vigorosas e menos sensíveis ao estresse ocasionado pelo transplantio no campo. Resultados semelhantes foram obtidos com o tratamento de substrato para a produção de mudas de café, onde foi observado um significativo desenvolvimento das plantas.

Existem muitas espécies de *Trichoderma* conhecidas pela ciência, cada uma com um potencial no controle de doenças. É importante conhecer que existem essas diferenças, pois, a exemplo de vários ingredientes ativos de fungicidas químicos, pode haver produtos comerciais de *Trichoderma* que não tenham efeito satisfatório para o controle específico de determinada doença.

Atualmente, um dos maiores problemas nas lavouras de soja, feijão e algodão é o mofo branco ocasionado por *Sclerotinia sclerotiorum*. O mofo branco sempre foi uma doença de maior severidade em lavouras irrigadas, principalmente para o feijoeiro, contudo foi registrado, em algumas lavouras de soja no estado de Goiás na safra de 2005/06, um prejuízo de até 20% no rendimento de grãos. Dois anos depois, na safra de 2007/08, o mofo branco foi mais importante do que a ferrugem asiática da soja, na opinião de muitos produtores, haja vista que existe um manejo eficiente para o controle da ferrugem bem conhecido pelos produtores, enquanto que o manejo do mofo branco ainda precisa ser mais aprimorado e divulgado.

O uso de isolado de *Trichoderma* não pode ser considerado como solução definitiva para o controle do mofo branco mas como uma ferramenta no manejo desta doença. Esse antagonista atua como medida preventiva, pois inativa os escleródios que produzirão os esporos para infectar o hospedeiro. Com esta redução de inóculo, uma menor incidência e/ou severidade da doença ocorrerá no campo, potencializando outras medidas de manejo. Com o uso contínuo do *Trichoderma* é possível uma redução do número de aplicações de fungicidas químicos e até mesmo a sua eliminação dependendo das condições ambientes, severidade da doença na área e de outras técnicas de manejo empregadas.

Uma redução significativa na incidência do mofo branco nas culturas da soja, feijão e algodão foi obtida quando o *Trichoderma* foi aplicado na concentração de 1 a 2 trilhões de esporos/ha em pós emergência. Com esta dosagem encontra-se cerca de 15.000 esporos/cm<sup>2</sup> de solo. São necessárias de duas a três aplicações dessa concentração durante o ciclo de produção. O número de aplicações depende da severidade da doença na área, sendo que não se deve realizar pulverizações em lavouras fechadas e durante o florescimento, pois o efeito “guarda-chuva” impede que o *Trichoderma* atinja o alvo que são os escleródios no solo. É recomendável a utilização do *Trichoderma* após a colheita, principalmente nas áreas onde o cultivo safrinha é praticado. Neste momento, os restos culturais estão secos e apropriados para a colonização do fungo, além dos escleródios encontrarem-se mais expostos na superfície do solo, alvos mais fáceis para os esporos de *Trichoderma*.

O tratamento de sementes com *Trichoderma* tem controlado patógenos que ocasionam o tombamento de plantas como *Fusarium* e *Rhizoctonia solani*. Porém, não é prática indicada para o controle do mofo branco, pois a área de atuação do *Trichoderma* é somente ao redor da semente e os escleródios estão distribuídos em toda a lavoura. Neste caso, a aplicação via pulverização com barra ou pivô central é recomendada, pois os esporos de *Trichoderma* têm maior chance de entrar em contato com os escleródios e inativá-los. É recomendado que o fungo seja aplicado no período da tarde, pois os raios UV diminuem a sua germinação. A aplicação conjunta em mistura de tanque com outros agrotóxicos ou fertilizantes não é proibitiva, porém cada produto deve ser avaliado individualmente, sendo prudente consultar o fabricante antes de efetuar a aplicação.

## Considerações Finais

Existe mais de 50 produtos à base de *Trichoderma* comercializados no mundo. Esses produtos são recomendados para diferentes culturas. Em teoria, o *Trichoderma* poderia ser recomendado para praticamente todas as culturas que apresentam problemas com patógenos do solo. Entretanto, produtos biológicos, como os à base de *Trichoderma*, são compostos por seres vivos, a exemplo de inoculantes. Assim, para boa eficiência é necessário que estejam viáveis e na concentração adequada. É recomendável que o produtor exija das empresas que comercializam produtos biológicos a apresentação de informações sobre a concentração, viabilidade e nível de contaminação do produto, realizados por laboratórios de fitopatologia ou microbiologia de universidades ou centros de pesquisa, antes de adquiri-lo, garantindo a sua eficiência sem onerar o custo de produção.

A utilização do controle biológico no mercado mundial é tímida em relação à expectativa de cientistas, fabricantes e consumidores, mesmo levando-se em consideração os claros benefícios inerentes à técnica. Segundo dados apresentados em um workshop realizado em Nova Jersey em 1998, o mercado de produtos biológicos no final da década de 90 foi cerca de US\$380 milhões, ou seja, apenas 1,4% dos US\$28 bilhões gastos com agrotóxicos no mercado mundial. Deste universo, cerca de US\$308 milhões foram de produtos à base de *Bacillus thuringiensis*. Atualmente, no mercado mundial, o controle biológico é relegado a nichos específicos com alto valor agregado, e mesmo assim, vem perdendo espaço para os produtos transgênicos ou agrotóxicos mais modernos e ditos “ecologicamente corretos”.

Um dos principais objetivos do controle biológico é colaborar para diminuir o uso de agrotóxicos. No entanto, esta meta não está sendo atingida. Em parte, pode-se explicar que esta realidade é ocasionada pelas dificuldades e problemas inerentes à produção e comercialização desses produtos, e que é difícil seguir o modelo adotado pelas indústrias químicas voltado, principalmente, para a utilização em grandes culturas com custos reduzidos de produção e prolongada vida de prateleira.

No Brasil, a situação não é diferente. Embora exista no mercado dezenas de produtos à base de fungos e bactérias, a utilização, principalmente em grandes culturas como a soja e o algodão, é restrita. É necessário refletir sobre dois pontos de vista, o do empresário e o do consumidor. O primeiro sofre com toda a burocracia, tempo e custo elevado do processo de registro dos produtos, além de uma carência de pesquisa, objetivando colocar no mercado um produto melhor, seja relacionado à produção, formulação ou tecnologia de aplicação. O consumidor perde a credibilidade em produtos que não são registrados, normalmente onerosos e que muitas vezes não apresentam a eficiência prometida, normalmente por problemas de perda de viabilidade do antagonista ou falha na sua aplicação. Com o intuito de organizar a cadeia produtiva e para fornecer segurança ao consumidor final desses produtos, foi criada em novembro de 2007 a ABCBio - Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico. Essa associação, dentre outras funções, criará normas para os testes de controle de qualidade, protegerá o consumidor contra produtos inferiores e defenderá pelos interesses do setor frente aos órgãos governamentais, além de divulgar a técnica, buscando novos mercados e ampliando os atuais.

## Referências

- Ahmad, J.S. & Baker, R. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189. 1987.
- Altomare, C.; Norvel, W.A.; Biörkman, T. & Harman, G. E. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol by fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2926-2933. 1999.
- Baker, K.F. & Snyder, W.C. *Ecology of Soil-Borne Plant Pathogens: Prelude to Biological Control*. Berkeley. University of California Press. 1965.
- Distefano, G.; La Malfa, S.; Vitale, A.; Loreito, M.; Deng, Z. & Gentile, A. Defence-related gene expression in transgenic lemon plants producing an antimicrobial endochitinase during fungal infection. *Transgenic Research*. Disponível online. 2008.
- Harman, G. E.; Howell, C.R.; Viterbo, A.; Chet, I. & Loritto, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2: 43-56. 2004.
- Paulitz, C.T. & Belanger, R.R. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133. 2001.
- Whips, J. M. Development in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 1-134. 1997.



## Capítulo 16

# Controle Biológico da Vassoura-de-Bruxa do Cacaueiro na Bahia, Brasil

João de Cássia do Bomfim Costa<sup>1</sup>, José Luiz Bezerra<sup>1</sup>,  
Lindolfo P. Santos Filho<sup>1</sup>, Marcelo de Carvalho Alves<sup>2</sup>  
& Euvaldo Marques Moura<sup>1</sup>

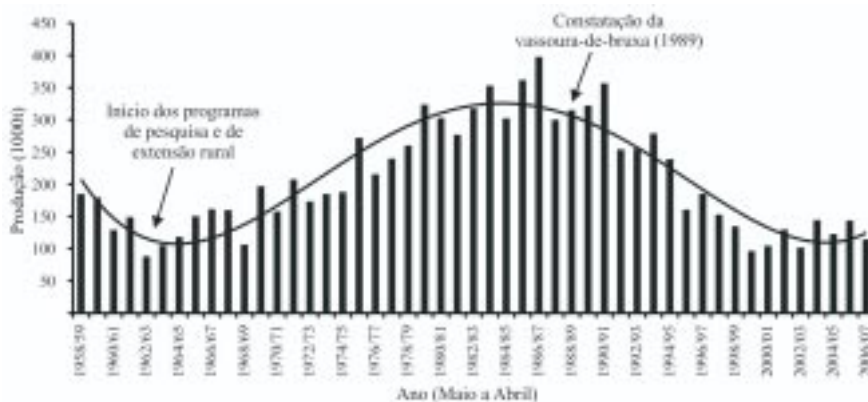
<sup>1</sup>Mapa/Ceplac/Cepec, CP: 07, 45600-970 Itabuna, BA, Brasil.  
e-mail: jcbcosta@uol.com.br; jlulabezerra@hotmail.com. <sup>2</sup>UFMT/FAMEV/DSER,  
Av. Fernando Corrêa da Costa S/N, Coxipó, 78060-900 Cuiabá, MT, Brasil.

## Introdução

A vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora, é considerada uma das mais importantes enfermidades do cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) (Purdy & Schmidt, 1996; Griffith, 2004). Na região amazônica brasileira, chega a causar perdas de até 70% na produção de frutos em plantios comerciais com mais de seis anos de idade, especialmente no estado de Rondônia (Bastos, 1990).

Na década de 1970, o Brasil era o segundo maior produtor mundial de cacau. Atualmente, está em sexto lugar, com 140.000 toneladas, correspondendo a 4,1% da produção mundial (Agrianual, 2008). O continente africano, ainda isento da doença, é responsável por 70,6% da produção mundial, concentrada principalmente na Costa do Marfim (37,3%) (QBCS, 2006/07).

A produção brasileira está concentrada nos estados do Mato Grosso (0,1%), Amazonas (0,7%), Espírito Santo (4,1%), Rondônia (6,9%), Pará (19%) e Bahia (70%). Este último, durante décadas, teve a cacauicultura como a principal atividade agrícola e de grande importância econômica, até maio de 1989 (Okabe *et al.*, 2004; Agrianual, 2008). A partir de então, a vassoura-de-bruxa disseminou-se por toda a região cacaueira, provocando um decréscimo acentuado na produtividade, com grande impacto econômico, ambiental e social. Com isso, o Brasil passou de exportador a importador de cacau, devido à necessidade de manter o parque moageiro abastecido (Agrianual, 2000) (Figura 1).



**Figura 1.** Produção de cacau em amêndoas (sacas de 60 kg) no estado da Bahia, no período de 1958/59 a 2006/2007 (Adaptado de COMCAUBA, 2007).

Como primeiras formas de controle da doença preconizaram-se a utilização da poda fitossanitária, que se mostrou muito onerosa e o controle químico, pouco eficiente na proteção das plantas, além de causar grande prejuízo ao ambiente. Métodos isolados de controle da doença empregando o controle químico, cultural, genético ou biológico não ofereceram resultados satisfatórios. Atualmente, as medidas para o controle da vassoura-de-bruxa preconizam a necessidade do manejo integrado da doença.

Em vista disso, as pesquisas para a obtenção de variedades resistentes, a indução de resistência do hospedeiro e a busca de fungos antagonísticos a *Moniliophthora perniciosa* constituem as linhas atuais mais promissoras para o controle da vassoura-de-bruxa, de forma mais econômica e com menor impacto ambiental.

Pesquisas pioneiras com a microbiota associada à vassoura-de-bruxa do cacauero mostraram que o controle biológico de *Moniliophthora perniciosa*, durante a sua fase saprofítica, é possível pela exploração de microrganismos antagonísticos e competidores (Bravo & Hedger, 1988). Resultados promissores com o fungo *Hypocrea stromatica* Bezerra, Costa & Bastos (anamorfo: *Trichoderma stromaticum* Samuels & Pardo-Schulth.), antagonístico a *Moniliophthora perniciosa*, originário da região amazônica, foram obtidos em pesquisas de campo, no estado do Pará (Bastos, 1988; Bastos, 2000) e na Bahia (Costa *et al.*, 1998).

Neste capítulo, pretende-se apresentar alguns aspectos das pesquisas realizadas na Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac-Bahia), órgão subordinado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), objetivando desenvolver uma tecnologia de controle biológico para a vassoura-de-bruxa do cacauero em condições de campo, com ênfase na produção de um biofungicida com o fungo *Trichoderma stromaticum* como ingrediente ativo.

## Cacaueiro

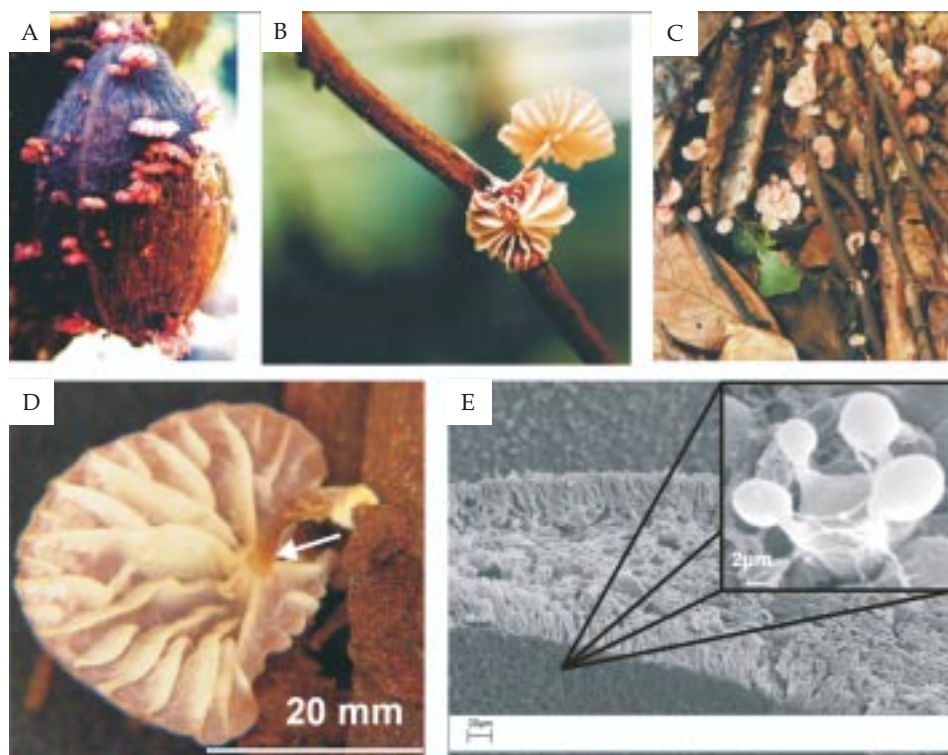
O cacaueiro é uma planta da família Malvaceae (Alverson *et al.*, 1999; APG II, 2003), originária da América do Sul, provavelmente das bacias dos rios Amazonas e Orinoco, onde foi encontrado em condições naturais, sob dossel de grandes árvores da floresta tropical. Pode atingir de 5 a 8 m de altura e 4 a 6 m de diâmetro da copa, em plantios provenientes de semente e 20 m de altura, em condições silvestres. Dentre as 22 espécies do gênero, apenas o cacaueiro e o cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) são explorados comercialmente no Brasil, para a fabricação de chocolate e derivados. O cacaueiro possui frutos com pericarpo carnoso, composto por três partes distintas: o epicarpo, que é carnoso e espesso e cujo extrato epidérmico exterior pode estar pigmentado; o mesocarpo delgado e duro, mais ou menos lignificado e o endocarpo, que é carnoso, mais ou menos espesso (Silva Neto, 2001; Monteiro & Ahnert, 2007).

## Vassoura-de-Bruxa

A vassoura-de-bruxa do cacaueiro foi observada pela primeira vez no Suriname, em 1895 (Holliday, 1952). Essa enfermidade tem ampla distribuição geográfica nos países produtores de cacau da América do Sul e Central, como Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Venezuela, Panamá e nas Ilhas do Caribe, Trinidad & Tobago, Granada, Santa Lucia e São Vicente (Bastos, 1990; Silva *et al.*, 2002). O primeiro registro da doença na Bahia ocorreu no município de Uruçuca, em 22 de maio de 1989 (Pereira *et al.*, 1989). Em fevereiro de 2001, foi constatada em Linhares, estado do Espírito Santo (Silva *et al.*, 2002).

**Etiologia.** A enfermidade é causada por um fungo pertencente à classe Basidiomycetes, à ordem Agaricales e à família Marasmiaceae. O agente etiológico foi descrito primeiramente, por Stahel, como *Marasmius perniciosus* (Stahel, 1915), sendo transferido posteriormente, por Singer, para *Crinipellis perniciososa* (Stahel) Singer (Singer, 1942). Em 2005 o fungo foi reclassificado como *Moniliophthora perniciososa* (Stahel) Aime & Phillips-Mora (Aime & Phillips-Mora, 2005) com base em características moleculares. Segundo esses autores, não há como distinguir morfologicamente os gêneros *Moniliophthora* e *Crinipellis*. O Código Internacional de Botânica (McNeill *et al.*, 2006) sanciona este critério taxonômico para separar gêneros de fungos, embora não haja unanimidade entre os taxonomistas sobre a aplicação desta regra do Código.

O patógeno é um parasita hemibiotrófico que possui duas fases fisiológicas e morfológicas distintas. Uma delas é parasítica, monocariótica, de crescimento intercelular, com ausência de grampos de conexão, encontrada em tecidos vivos, enquanto que a outra é saprofítica, dicariótica, com crescimento intracelular e presença de grampos de conexão, encontrada somente em tecidos mortos (Luz *et al.*, 1997). Os basidiomas são produzidos em todos os tecidos afetados depois de mortos e mumificados, tanto na planta como na serapilheira. Segundo Bastos (1990), o micélio secundário do fungo não é infectivo, somente os basidiósporos, incolores e com dimensões de 10 a 14 mm x 4 a 5 mm, que são produzidos no interior dos basidiomas, são capazes de induzir a doença (Figura 2).



**Figura 2.** Basidiomas de *Moniliophthora perniciosa* em fruto de cacau (A), em vassouras (B, C), himenóforo do patógeno com lamelas e lamélulas esparsas (note o estipe excêntrico do basidioma, seta) (D) e projeção de um corte transversal de uma lamela e basídio em vista frontal, com quatro basidiósporos presos aos esterigmas (E).

**Hospedeiros.** O fungo *Moniliophthora perniciosa*, considerado endêmico na bacia Amazônica (Bastos, 1990), além de afetar o cacauzeiro, também atinge outras espécies do gênero *Theobroma* e *Herrania*, como *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) K. Schum. (cupuaçu), *Theobroma bicolor* Humb. & Bompl. (cacau-do-pará), *Theobroma microcarpum* Mart. (cacau-jacaré), *Theobroma subincanum* Mart. (cupuí), *Theobroma obovatum* Klotzsch ex Bernoulli (cacau-cabeça-de-urubu), *Theobroma speciosum* Willd. ex Spreng. (cacauí), *Herrania albiflora* Goudot, *Herrania nitida* (Poepp.) R.E. Schult. e *Herrania purpurea* (Pittier) R.E. Schult. Também infecta espécies da família Solanaceae pertencentes, principalmente, aos gêneros *Solanum* e *Capsicum*, como *Solanum lycocarpum* St. Hil. (lobeira), *Solanum paniculatum* L. (jurubeba), *Solanum gilo* Raddi (jiló), *Solanum stipulaceum* Willd ex Roem. & Schult. (caiçara), *Solanum melongena* L. (berinjela), *Solanum lasiantherum* Van Heurck & Müll. Arg. (sem nome vulgar), *Solanum rugosum* Dunal (juçara), *Capsicum annum* L. (pimentão), *Capsicum frutescens* L. (pimenta malagueta) e *Athanaea* aff. *pogogena* (Moric) Sendth (sem nome vulgar) e membros da família Bixaceae, como *Bixa orellana* (urucum). Há relatos sobre esse fungo colonizando lianas das famílias *Fabaceae* como *Entada gigas* (L.) Fawc. & Rendle e *Malpighiaceae* como *Mascagnia sepium* (A. Juss.) Griseb., *Heteropterys acutifolia* A. Juss. e *Stigmatophylum* sp. (cipó-silvestre) (Thorold, 1975; Evans, 1978;

Bastos & Evans, 1985; Wood & Lass, 1985; Bastos & Andebrhan, 1986; Bastos *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1992; Luz *et al.*, 1997; Resende *et al.*, 1997; Bastos *et al.*, 1998; Resende *et al.*, 1998; Resende *et al.*, 2000; Bastos & Albuquerque, 2006; Oliveira & Luz, 2007).

**Sintomas.** A sintomatologia da vassoura-de-bruxa foi detalhadamente descrita em plântulas por Silva *et al.* (2002) e plantas adultas por diversos autores, como Holliday (1952), Baker & Holliday (1957), Thorold (1975), Evans (1981), Rudgard (1989), Tovar (1991) e Bastos & Albuquerque (2006) entre outros. A infecção ocorre principalmente nos tecidos meristemáticos em crescimento, como brotos vegetativos, almofadas florais e frutos com variação de sintomas envolvendo hipertrofia e outras anormalidades (Figura 3).

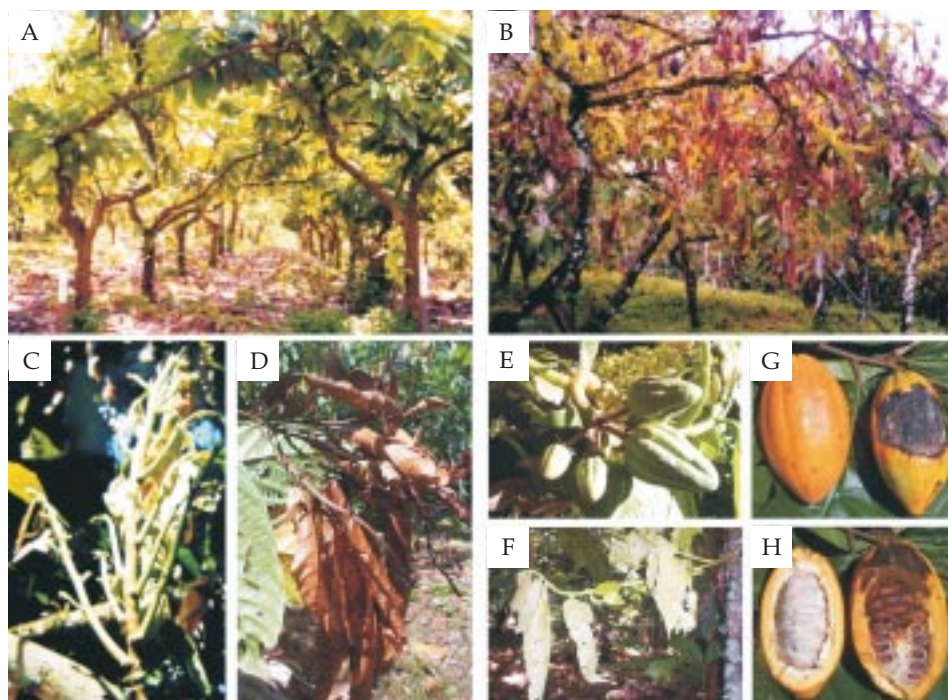
Nos lançamentos foliares, a hipertrofia é acompanhada de brotação intensa de gemas laterais, proporcionando características de uma vassoura. Os lançamentos infectados são de diâmetro maior que os sadios, com entrenós curtos e folhas geralmente grandes, curvadas e retorcidas. A princípio, as vassouras são verdes – vassouras vegetativas – e, posteriormente, secam e morrem, adquirindo coloração marrom-escuro – vassouras necróticas (Figuras 3C e D).

As almofadas florais infectadas transformam-se em agrupamentos de flores anormais, hipertrofiadas, de pedicelo alongado e inchado, originando frutos deformados, que podem exibir uma variedade de sintomas, dependendo do tipo de infecção e da idade. A infecção é indireta, quando ocorre a partir do pedicelo das flores e direta, por esporos através do epicarpo.

Os frutos são partenocárpicos, quando originados de flores afetadas, tomando a forma de “morango”, que não evoluem em tamanho, são verdes ou avermelhados, dependendo da variedade de cacau, tornando-se negros e petrificados quando secos (Figura 3E). Quando os frutos são infectados diretamente ainda jovens (cerca de 1 cm de comprimento), tomam a forma de “cenoura”, paralisando o crescimento com, aproximadamente, 15 cm de comprimento, antes de se tornarem negros e petrificados.

Os frutos jovens (2 a 5 cm de comprimento), quando infectados, tornam-se inchados e deformados, com amadurecimento precoce. Os frutos infectados tardiamente (2 a 3 meses de idade) desenvolvem manchas negras, brilhantes de formato mais ou menos circular quando maduros, tornando-se secos e petrificados com o desenvolvimento da infecção. A colonização de *Moniliophthora perniciosa* ocorre, primeiramente, nos tecidos internos do fruto, aderindo as sementes fortemente entre si. Quando ocorre o aparecimento dos sintomas, as sementes estão imprestáveis para o consumo (Figuras 3G e H).

**Epidemiologia.** A frequência e a duração das chuvas são fatores importantes na produção de basidiomas. As condições ideais para o fungo são precipitação anual entre 1.500 e 2.000 mm, temperatura de 24 °C a 26 °C e umidade relativa do ar de 80% a 90%. Precipitação mensal menor que 100 mm ou maior de 300 mm reduz a produção de basidiomas (Andebrhan, 1985; Costa *et al.*, 1997). Chuvas contínuas e fortes ou períodos secos prolongados inibem a produção de basidiomas (Thorold, 1975; Holliday, 1970). Um basidioma se mantém ativo durante cinco a oito dias, em média, liberando milhares de esporos nas primeiras horas do dia (Rudgard, 1987). Com a umidade relativa baixa, estes perdem a turgidez, só voltando a produzir esporos depois que a umidade se eleva novamente à saturação.



**Figura 3.** Área isenta de sintomas da vassoura-de-bruxa (VB) do cacau (A) e área severamente afetada pela enfermidade (B); tipos de vassouras em lançamentos foliares (C, D); VB em almofadas florais: frutos partenocárpicos (morangos) (E) e vassoura vegetativa (F); fruto sadio (esquerda) e fruto com sintoma da VB (direita) (G); seção longitudinal de fruto sadio (esquerda) e de fruto com sintoma da VB (direita) (H).

A disseminação de *Moniliophthora perniciosa* é feita por basidiósporos, únicas unidades infectivas do patógeno, que são produzidos na superfície de lamelas situadas no himenóforo dos basidiomas, em células especializadas denominadas basídios, de onde são liberados ativamente (ejetados). O principal mecanismo de disseminação da doença é pelo ar, embora chuvas não deixem de exercer também um importante papel (Evans, 1981; Andebrhan, 1988). Os basidiósporos, cuja liberação ocorre, geralmente, entre as 18 h e 6 h da manhã, são levados pelas correntes aéreas (disseminação) e necessitam ser depositados rapidamente sobre os tecidos em crescimento (sítios de infecção) do hospedeiro. Nesses locais, os esporos germinam e penetram. Após uma hora de exposição ao ar livre, submetidos à radiação solar e ao dessecamento, os basidiósporos perdem a viabilidade. A quantidade de basidiósporos no ar reduz sensivelmente em distâncias superiores a 300 m da fonte de inóculo, embora possa ocorrer alguma deposição de esporos e infecções em plantas situadas a alguns quilômetros da fonte de inóculo, quando as condições atmosféricas são favoráveis à disseminação (Luz *et al.*, 1997).

Para que haja infecção, é preciso que os basidiósporos sejam depositados sobre regiões meristemáticas (gemas vegetativas, florais e ou frutos em formação até os três meses de idade), onde penetram diretamente ou pelos estômatos. Nas gemas dormentes, a infecção torna-se latente, assumindo o aspecto de pequenos cancros

ou pontos necróticos que entram em atividade quando a planta reinicia a brotação. Essas infecções latentes têm importância epidemiológica, pois permitem a sobrevivência do fungo entre os períodos sucessivos de crescimento (lançamentos foliares) e de frutificação (safras) da planta (Luz *et al.*, 1997).

Segundo Luz *et al.* (1997), nos tecidos infectados ocorre intensa multiplicação celular (hipertrofia) que dura algumas semanas e, em seguida, ocorre morte das células e necrose generalizada dos tecidos. Nos tecidos necrosados (frutos e vassouras secas), após um período de dormência, durante o qual o micélio saprofitico cresce e acumula energia, dá-se o aparecimento dos basidiomas ou frutificações do patógeno. Esse ciclo de basidioma a basidioma ocorre uma vez por ano na Amazônia, mas, na Bahia, pode ocorrer até duas vezes: uma na safra temporã (1<sup>o</sup> semestre) e outro na safra principal (2<sup>o</sup> semestre). A vassoura-de-bruxa é, portanto, uma doença monocíclica, pois os tecidos infectados não produzem novos esporos capazes de iniciar novas infecções na mesma estação (safra). Embora esporos possam estar sendo liberados durante toda a estação, eles provêm de basidiomas desenvolvidos em tecidos infectados em estações anteriores.

Os períodos médios de duração das diferentes fases do ciclo vital de *Moniliophthora perniciosa* foram estudados, na Bahia, por Luz *et al.* (1994) e são: período de incubação - 4 semanas; período entre o aparecimento de vassouras verdes e o seu secamento - 7,5 semanas; período de dormência das vassouras secas - 13 semanas, podendo variar para mais ou para menos, dependendo do tamanho e da localização da vassoura; período de atividade da vassoura seca - 22 meses; período de atividade do fruto mumificado - 24 meses; período de liberação de esporos - o ano todo (na Bahia), na dependência de chuvas, com picos maiores nos meses mais frios (julho, agosto e setembro) e menores variando de época, de ano para ano (Almeida & Luz, 1995).

## **Manejo Integrado da Vassoura-de-Bruxa**

O manejo da doença é feito mediante a poda fitossanitária de todos os tecidos infectados antes da estação chuvosa, porém, essa prática é trabalhosa e cara. A aplicação de fungicidas é um complemento à poda fitossanitária e visa impedir a formação de basidiomas nas partes vegetais removidas. O uso de fungicidas representa custo adicional expressivo. O controle genético é medida de médio e longo prazo, duradoura, porém, não definitiva, devido à variabilidade do fungo, que acarreta a necessidade permanente do desenvolvimento de novas variedades resistentes. A indução de resistência baseada na ativação de mecanismos de defesa latentes no cacaueiro, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, pode se tornar mais uma estratégia interessante de controle alternativo, porém, ainda carente de estudos em campo. O controle biológico utilizando antagonistas, por sua vez, representa uma opção para o manejo integrado da doença, com as vantagens do baixo custo e de constituir uma tecnologia mais segura para o ambiente. Maiores detalhes podem ser obtidos em Pereira & Valle (2007). Até o presente momento, a estratégia ideal tem sido a adoção conjunta de todas essas técnicas no manejo integrado da doença.

## Controle Biológico

O controle biológico de doenças de plantas refere-se à destruição parcial ou total de populações de patógenos por outros organismos que ocorrem habitualmente na natureza (Agris, 2005) ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem (Cook & Baker, 1983). O conhecimento dos mecanismos envolvidos no controle biológico é de fundamental importância para aumentar as vantagens competitivas no ambiente. Os principais mecanismos das interações antagonísticas entre microrganismos incluem a competição, a antibiose e o micoparasitismo, além da indução de resistência no hospedeiro (Melo, 1996; Moore-Landecker, 1996; Tronsmo & Hjeljord, 1998). Existem tipos alternativos de interação entre espécies fúngicas: entrelaçamento, quando as hifas de duas colônias se encontram e se entrelaçam; impasse (“deadlock”), quando as hifas de colônias diferentes ao se encontrarem permanecem estacionárias; e, substituição, quando as hifas de uma colônia crescem substituindo as hifas da outra (Moore-Landecker, 1996).

Nos estudos do controle biológico clássico feitos pela introdução e/ou aplicação de inimigos naturais vivos de *Moniliophthora perniciosa* foram identificados fungos antagonísticos na forma hiperparasítica que atacam basidiomas ou colonizam tecido doente morto em competição com o patógeno (Rudgard *et al.*, 1993).

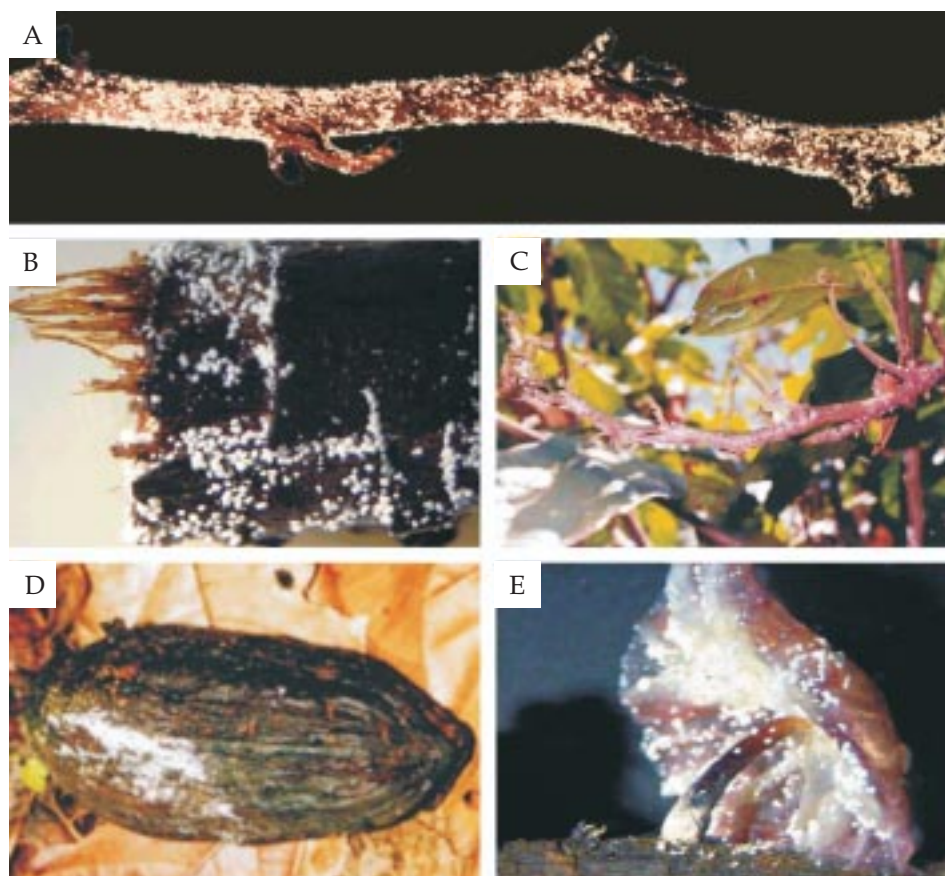
O controle biológico durante a fase saprofítica de *Moniliophthora perniciosa* pode se tornar uma estratégia possível pela exploração do antagonismo e competição de microrganismos (Bravo & Hedger, 1988). Vários fungos têm sido encontrados inibindo o crescimento e a reprodução de *Moniliophthora perniciosa*, destacando-se *Cladobotryum amazonense* C.N. Bastos, H.C. Evans & Samson (Bastos *et al.*, 1981; Bastos *et al.*, 1986). Segundo Bravo & Hedger (1988), um organismo competidor, para ser bem sucedido, deve ser capaz de substituir completamente o micélio de *Moniliophthora perniciosa* dentro da lignocelulose, impedindo, dessa forma, a produção de basidiomas.

Durante o processo de seleção de antagonistas podem ser encontrados fungos, bactérias ou actinomicetos, com atividades inibitórias sobre o patógeno alvo. Os resultados mais positivos na região cacaueira até o momento foram verificados com a aplicação de *Trichoderma* e *Clonostachys*, considerados os micoparasitas que apresentam o maior número de vantagens e, portanto, são os mais estudados no controle biológico de enfermidades de plantas (Melo, 1996).

**Controle Biológico com *Trichoderma*.** O gênero *Trichoderma* consiste de um grupo de fungos saprófitas e micoparasitas encontrados principalmente no solo e restos vegetais em decomposição. Espécies de *Trichoderma* são documentadas limitando o crescimento de muitos fungos fitopatogênicos em raízes e folhas e são usadas como agentes de biocontrole para a proteção de várias culturas contra diferentes gêneros de fungos, como é o caso de *Trichoderma koningii* no controle de *Sclerotium cepivorum*, causador da podridão-branca da raiz de cebola (Metcalfe *et al.*, 2004), de *Trichoderma harzianum* no tratamento de sementes de milho, reduzindo os sintomas de antracnose, causada por *Colletotrichum graminicola* (Harman *et al.*, 2004b) e *Trichoderma virens*, no controle do tombamento em plântulas de algodão, causado por *Rhizopus oryzae* e *Pythium* (Howell, 2002).



A capacidade antagonística do *Trichoderma* foi descrita em meados do século XX (Weindling, 1932), porém, só recentemente, com o interesse voltado para o controle biológico e o desenvolvimento da biotecnologia em agricultura, é que produtos comerciais foram desenvolvidos. Podem ser citados como exemplo F-Stop<sup>®</sup>, Trichodex<sup>®</sup> e Supravit<sup>®</sup>, à base de *Trichoderma harzianum*, registrados para uso em Israel no controle de doenças causadas por *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea* e *Sclerotium rolfsii* (Melo, 1998) e Trichodermil<sup>®</sup>, a base de *Trichoderma harzianum* registrado no Brasil para o controle de patógenos de solo em feijoeiro (Bettiol & Morandi 2008). Um produto (Tricovab<sup>®</sup>) formulado a partir de *Trichoderma stromaticum* está sendo disponibilizado pela Ceplac/Cepec para o controle da vassoura-de-bruxa do cacauero (Bastos & Dias, 1992; Oliveira & Luz, 2005; Samuels *et al.*, 2000) (Figura 4).



**Figura 4.** Pústulas de *Trichoderma stromaticum* parasitando vassouras necróticas (A e B) e plesionecróticas (C), fruto mumificado de *Theobroma cacao* (D) e basidioma de *Moniliophthora perniciosa* (E).

O potencial de uso de *Trichoderma* como agente controlador de doenças de plantas é resultado de inúmeros fatores, como a ação competitiva por fontes de energia, a produção de antibióticos ou outros metabólitos que inibem a atividade do patógeno e o efeito predatório ou micoparasitismo (Chet, 1987), bem como sua habilidade de promover o crescimento e o desenvolvimento de plantas (Harman *et al.*, 2004a). Além do mais, *Trichoderma* pode ser considerado um bom microrganismo para controle biológico, devido a algumas características principais, como: rápido crescimento; poucos requisitos nutricionais; produz esporos e clamidósporos; produz enzimas líticas que digerem a parede celular de fitopatógenos; produz metabólitos voláteis e não voláteis; produz fatores que regulam o crescimento das plantas; adquire resistência aos fungicidas com facilidade; apresenta ciclo parassexual conhecido em algumas espécies, o que facilita os estudos de genética clássica; é facilmente mutável por meio de radiações ionizantes e não-ionizante e mutagênicos químicos; e, apresenta conídios uninucleados em muitas espécies, o que facilita a obtenção de mutantes estáveis (Melo, 1991).

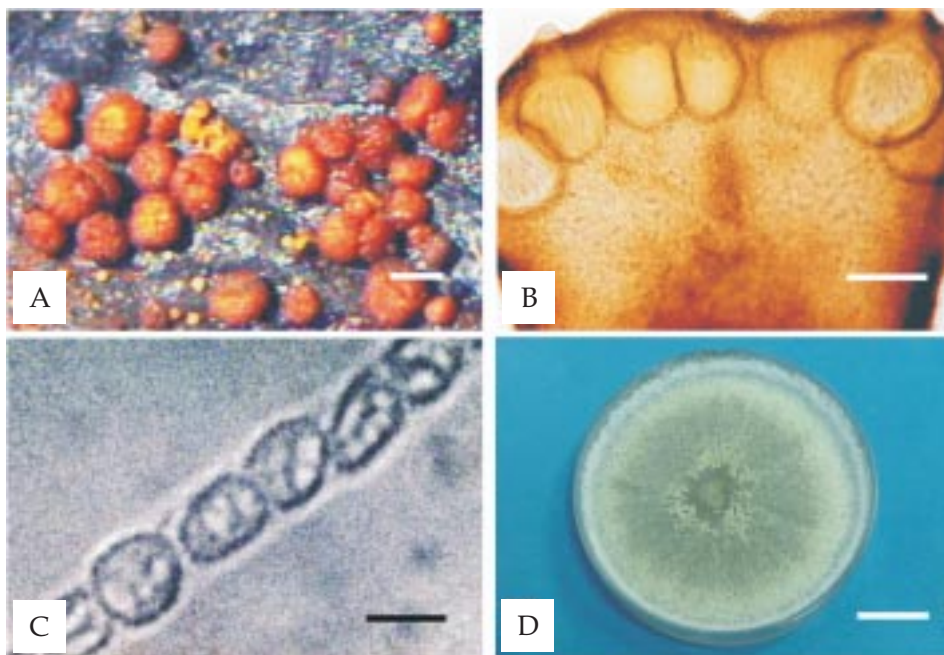
Bastos (1988) constatou, a partir de experimentos realizados em condições controladas, que um isolado de *Trichoderma*, obtido de vassouras-de-bruxa e aplicado em vassouras secas colonizadas por *Moniliophthora perniciosa*, provocou a paralisação na produção dos basidiomas. Em experimentos conduzidos no campo, utilizando vassouras colocadas no solo e na copa de cacauzeiros, o antagonista reduziu significativamente a produção de basidiomas (Bastos, 1988). Esse antagonista, equivocadamente classificado como *Trichoderma viride* (Bastos, 1988) e *Trichoderma polysporum* (Costa *et al.*, 1996), foi reclassificado como uma nova espécie, denominada de *Trichoderma stromaticum* (Samuels *et al.*, 2000). Samuels *et al.* (2008) disponibilizaram uma chave interativa (“*Trichoderma* Home”, <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>) com imagens, descrições, distribuição e nomenclatura do gênero *Trichoderma*, como parte de um projeto sobre o estudo de *Hypocreales*: *Hypocrea* e *Hypomyces*, financiado pela Fundação Nacional de Ciências, hospedado e atualizado pelo “Systematic Mycology & Microbiology Lab, Agricultural Research Service, ARS, USDA”.

O teleomorfo de *Trichoderma stromaticum* foi descoberto e descrito em vassouras e frutos secos de cacauzeiro e outras espécies de *Theobroma*, na Bahia, como *Hypocrea stromatica* Bezerra, Costa e Bastos (Bezerra *et al.*, 2003), conforme ilustração de microscopia de luz (Figura 5) e eletrônica (Figura 6).

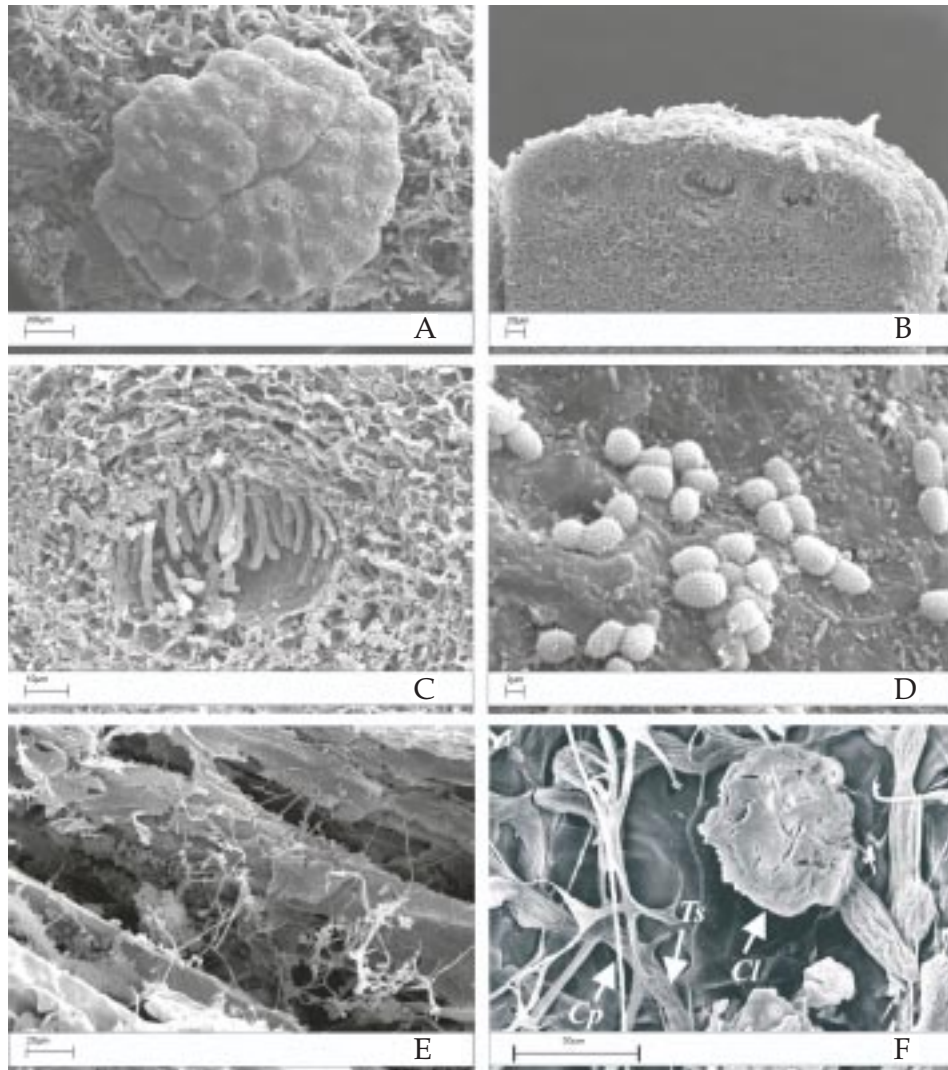
Costa *et al.* (1995) observaram inibição expressiva da produção de basidiomas de *Moniliophthora perniciosa* em “vassoureira” por um isolado de *Trichoderma stromaticum*, na região cacauzeira da Bahia. Em outro trabalho na região de Uruçuca (BA), Costa *et al.* (1998) verificaram redução de 99,7% no número de basidiomas nas vassouras deixadas na serapilheira e de 56,6% nas vassouras penduradas na copa dos cacauzeiros. Estudos realizados no campo, em Marituba (PA), mostraram que *Trichoderma stromaticum* reduziu a infecção em ramos e almofadas florais e a formação de basidiomas nas vassouras deixadas tanto na copa quanto na serapilheira dos cacauzeiros (Bastos, 2000).

Em experimentos buscando ajustar o número de aplicações de *Trichoderma stromaticum* para efetiva redução da produção de basidiomas no campo, na Bahia, observou-se redução de 64% na produção de basidiomas em vassouras que receberam quatro aplicações de *Trichoderma stromaticum*, durante o período chuvoso (a partir de junho). As duas primeiras foram realizadas com intervalo de 15 dias e as duas seguintes com 30 dias, mais quatro remoções de vassoura-de-bruxa anuais. A testemunha, neste caso, consistiu em quatro remoções a cada 90 dias (a partir de maio), sem aplicação de *Trichoderma stromaticum* e de óxido cuproso (Costa *et al.*, 2000).

Para investigar o mecanismo de ação de *Trichoderma stromaticum* sobre *Moniliophthora perniciosa*, foram retiradas amostras de ramos de cacauete hipertrofiados e secos (vassouras secas), encontradas na serapilheira do cacauete. As amostras foram processadas pelo método convencional de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Constatou-se a presença de hifas de *Trichoderma stromaticum* parasitando hifas de *Moniliophthora perniciosa* no interior de vassouras secas de cacauetes, além de clamidósporos e conídios do antagonista (Costa *et al.*, 2001) que, posteriormente, também foram caracterizados morfológicamente por meio de microscopia eletrônica de varredura (Melo & Faull, 2004).



**Figura 5.** *Hypocrea stromatica*. (A) Vista frontal dos estromas, (B) corte longitudinal de um estroma mostrando peritécios e ostíolos, (C) segmento de um asco com ascósporos bicelulares, unisseriados, verrugosos (D) cultura do anamorfo, *Trichoderma stromaticum*, originária da germinação de ascósporos; comprimento das barras: (A) = 0,8  $\mu\text{m}$ ; (B) = 120  $\mu\text{m}$ ; (C) = 5  $\mu\text{m}$ ; e (D) = 2 cm (Fonte: Bezerra *et al.*, 2003).



**Figura 6.** Eletromicrografias de *Hypocrea stromatica* (A, B, C, D) e de *Trichoderma stromaticum* (E, F), referentes à vista superior de estroma (A), corte longitudinal de um estroma com peritécios (B), detalhe do peritécio (C), ascósporos verrugosos, alguns inteiros, outros com as duas metades separadas (D), massas conidiais (E), clamidósporo (Cl), hifas de *Trichoderma stromaticum* (Ts) e hifas de *Moniliophthora perniciosa* (Mp) (F).

Em vista da alta capacidade recombinatória de *Hypocrea stromatica*, estudou-se a diversidade genética de isolados de *Trichoderma* spp. coletados no Brasil com base em marcadores moleculares RAPD e marcadores morfológicos e biométricos, para analisar a similaridade genética entre o isolado de *Hypocrea stromatica* usado no biocontrole de *Moniliophthora perniciosa*, e um isolado mutante (TVC 5.15) resistente ao benomil (Tabela 1 e Figura 7) (Melo *et al.*, 2001). Verificou-

se alta variabilidade genética entre os isolados de *Trichoderma* spp. de cacauzeiro (1% a 85%). Não houve diferenciação genética entre os isolados do tipo selvagem e mutante (= 96%). As análises das características morfo-biométricas incluíram formas de conídios, tipos de fiáides, presença/ausência de clamidósporos, esporulação e tipos de coloração em meio de cultura. A característica tipo de fiáides foi a que mais contribuiu para a divergência dos isolados. Concluiu-se que o isolado do tipo mutante pode ser utilizado para estudos epidemiológicos por conservar as características genéticas da espécie e que marcadores moleculares têm potencial na indicação da capacidade antagonística de espécies de *Trichoderma* (Costa *et al.*, 2003). Posteriormente, Souza *et al.* (2006) observaram a existência de grupos genéticos distintos de *Trichoderma stromaticum* na região cacauzeira da Bahia por meio da técnica de AFLP, denominados de grupo I e II. Os autores levantaram hipóteses sobre a dispersão desses grupos ao longo da região cacauzeira da Bahia, com base em amostras coletadas em 19 municípios. Entretanto, estudos ainda devem ser realizados considerando-se a variabilidade de espécies de *Trichoderma* que, provavelmente, pode existir devido às variações dos agrossistemas nessas regiões evidenciadas por contrastes de solo, clima e dinâmica de uso, conforme relato de Silva & Leite (1970). Além disso, a existência do teleomorfo *Hypocrea stromatica*, na Bahia (Bezerra *et al.*, 2003), assegura a ocorrência de novas recombinações genéticas, aumentando a possibilidade da diversidade dessa espécie muito além da relatada por Souza *et al.* (2006) e Pomella *et al.* (2007).

## **Produção Massal de *Trichoderma stromaticum***

Um produto comercial (Tricovab®) à base de *Trichoderma stromaticum*, antagonista a *Moniliophthora perniciosa*, foi desenvolvido e é produzido na Unidade de Biocontrole do Cepec na Ceplac, em Itabuna, BA, desde 1999 (Figura 8) (Bezerra *et al.*, 2000).

Esse produto, obtido pela fermentação de *Trichoderma stromaticum* em arroz é recomendado para aplicação sobre as vassouras secas situadas no solo ou na copa dos cacauzeiros, inibindo a formação dos basidiomas de *Moniliophthora perniciosa*. O produto é usado com sucesso para reduzir o potencial de inóculo do patógeno nas plantações de cacau (Bezerra & Oliveira, 2008). A metodologia de produção massal do fungo vem sendo aperfeiçoada, com o objetivo de manter o custo baixo de produção e a produtividade elevada, para atender à grande demanda (Niella, 2005).

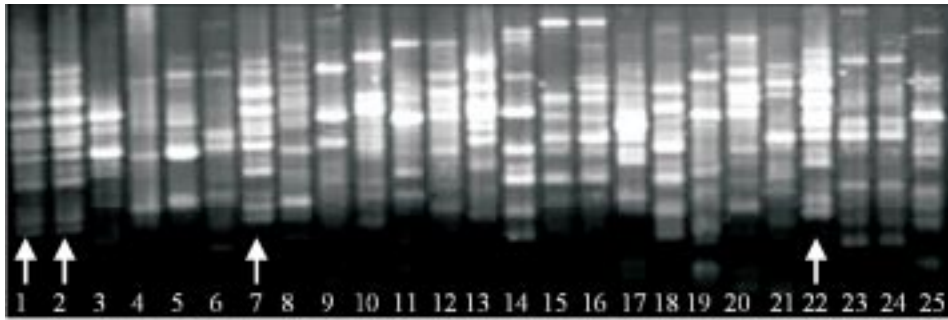
A produção do Tricovab® tem início com a multiplicação *in vitro* do fungo *Trichoderma stromaticum* em placas de Petri. Antes de ser utilizado, o inóculo passa por testes de qualidade para averiguar a presença de contaminantes. A semeadura no substrato (arroz) é realizada com pulverizador costal de pressão retida, acoplado a um cilindro de pressão. Após a inoculação, o substrato é mantido a 26 °C, por três a quatro dias, para que ocorra o desenvolvimento micelial. Nesta fase, ocorrem as maiores perdas por fungos oportunistas ou contaminantes (gêneros mais frequentes: *Penicillium*, *Aspergillus* e *Chrysonilia*).

**Tabela 1.** Dados de origem e características morfológicas e biométricas observadas em 27 isolados de *Trichoderma* spp. e dois de *Hypocrea stromatica*.

NR	Espécie	H	Isolado	Origem	CM	E	C	Cl	F
TVC	<i>T. stromaticum</i>	1	<i>In vitro</i>	CEPECB (BA)	0	4	3	2	3
1504	<i>T. stromaticum</i>	1	<i>In vitro</i>	RO	0	4	3	2	3
1051	<i>T. harzianum</i>	1	VR	RO	0	4	2	2	6
889	<i>T. harzianum</i>	1	Casqueiro	CEPEC (BA)	0	4	2	2	6
1052	<i>T. pseudokoningii</i>	1	Ramo	RO	1	2	3	1	1
854	<i>T. pseudokoningii</i>	1	Casqueiro	CEPEC (BA)	0	2	3	1	3
1643	<i>T. stromaticum</i>	1	<i>In vitro</i>	Belém (PA)	0	1	3	2	3
905	<i>T. viride</i>	1	Rizosfera	Uruçuca (BA)	0	4	2	2	6
2073	<i>Trichoderma</i> sp.	1	VR	Uruçuca (BA)	0	4	3	1	6
2074	<i>Trichoderma</i> sp.	1	VR	Uruçuca (BA)	0	4	2	1	6
2075	<i>Trichoderma</i> sp.	1	VR	Uruçuca (BA)	5	4	2	2	1
2076	<i>Trichoderma</i> sp.	1	VR	Uruçuca (BA)	4	4	2	2	1
2088	<i>Trichoderma</i> sp.	1	VR	Uruçuca (BA)	4	4	2	2	3
3187	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Jacareci (BA)	0	4	3	1	1
3188	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Jacareci (BA)	2	2	3	1	1
3189	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Jacareci (BA)	1	2	2	1	1
3190	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Jacareci (BA)	5	3	2	2	6
3221	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Jacareci (BA)	4	3	3	1	1
2982	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Belmonte (BA)	3	3	2	1	1
2983	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Belmonte (BA)	5	4	2	2	6
2984	<i>Trichoderma</i> sp.	1	Folha	Belmonte (BA)	1	2	3	2	1
2989	<i>T. stromaticum</i>	1	Folha	Camacan (BA)	0	4	3	2	3
2952	<i>Trichoderma</i> sp.	2	Folha	Porto Seguro (BA)	4	3	3	1	6
2981	<i>Trichoderma</i> sp.	2	Folha	Porto Seguro (BA)	0	3	3	1	3
3112	<i>Trichoderma</i> sp.	2	Folha	Porto Seguro (BA)	0	4	3	1	5
2994	<i>T. stromaticum</i> *	1	<i>In vitro</i>	BA	0	1	3	2	2
3106	<i>H. stromatica</i>	1	VR	CEPEC (BA)	0	1	3	2	3
3333	<i>H. stromatica</i>	1	VR	CEPEC (BA)	0	1	3	2	3
2995	<i>T. stromaticum</i> *	1	<i>In vitro</i>	BA	0	4	3	2	3

NR = número de registro na micoteca da Ceplac/Cepec; \* = isolado mutante resistente ao benomil (Melo *et al.*, 2001); H = hospedeiro: 1 = cacaueteiro e 2 = coqueiro; CM = cor em meio de cultura: 0 = incolor; 1 = 1A4; 2 = 1A8; 3 = 4B8; 4 = 4C6 e 5 = 4D8 (Kornerup & Wanscher, 1983); E = esporulação após 10 dias de crescimento em placa de Petri: 1 = ausência; 2 = 0% a 33%; 3 = 34% a 66% e 4 = >60%; C = forma dos conídios: 2 = globosos a subglobosos ou piriformes ou apiculados e 3 = elipsóides; Cl = clamidósporos: 1 = presente e 2 = ausente; F = filídes: 1 = típicas, médias; 2 = estreitas, finas, longas; 3 = curtas, gordas, pequenas; 5 = tipo *Clonostachys* e 6 = não-observadas e VR = vassoura de ramo.

A próxima etapa é a secagem, processo realizado com o auxílio de desumidificadores por cerca de 10 dias, quando os conídios atingem umidade de 8% a 10%. Entretanto, esta técnica precisa ser aprimorada, uma vez que a umidade ideal é abaixo de 5%. Pesquisas estão em andamento para desenvolver um secador visando diminuir o tempo nessa etapa. Após a secagem, o arroz contendo os conídios é levado para a separação. Utiliza-se, nessa fase, uma máquina extratora de conídios, composta de três partes: um motor, que desempenha a função de criar um fluxo contínuo de ar, cilindros coletores de conídios e um tambor giratório. Os conídios coletados são armazenados em câmara refrigerada (6 °C a 8 °C). Assim, seu poder germinativo é mantido acima de 80%, por mais de seis meses (Bezerra *et al.*, 2000; Niella, 2005).



**Figura 7.** Produtos de amplificação do DNA genômico de 25 isolados de *Trichoderma* spp. obtidos com a utilização do “primer” OPB15. Os números correspondem aos isolados listados na Tabela 1. As setas indicam o perfil de bandas diferenciadas dos isolados de *Trichoderma stromaticum*, em relação aos demais isolados (Costa *et al.*, 2003).



**Figura 8.** Unidade de Biocontrole do Cepec, na Ceplac, em Ilhéus, BA, utilizada para a produção do Tricovab® (A); preparo do substrato (B); autoclavagem do substrato (C); inoculação (D); secagem do produto (substrato + fungo) (E); equipamento separador de esporos do fungo da superfície do arroz (“MycHarvester”), doado pela “Masterfoods” (F); substrato + esporos (Tricovab®) (esquerda) e esporos de *Trichoderma stromaticum* (direita) (G).

Para ação do Tricovab® na Bahia, a Ceplac recomenda: uso de 40 g/ha do produto em cada aplicação; quatro aplicações anuais; intervalo de aplicação de 30 dias; aplicações no período de maio a agosto (após a remoção de vassouras e ajustado de acordo com as condições climáticas); para melhor suspensão, pré-diluir o Tricovab® em óleo agrícola a 1% e a seguir o preparo da calda deve ser realizado dissolvendo o Tricovab® em uma quantidade menor de água, coar em tecido fino e completar até atingir o volume estabelecido pelo teste de vazão; o volume de água a ser utilizado depende da calibragem do pulverizador (teste de vazão); a calda deve ser aplicada com pulverizador costal manual, bico tipo leque 110/02, com válvulas de pressão de 15 ou 30 libras/pol<sup>2</sup>; as aplicações devem ser realizadas no período chuvoso ou com alta umidade relativa do ar; a aplicação deve atingir todo o material infectado removido e casqueiros deixados sobre o solo; e, os equipamentos utilizados devem ser lavados bem com água e detergente antes e após a aplicação do produto. Essas recomendações são passíveis de alterações, considerando a obtenção de novos resultados de pesquisa em desenvolvimento.

Segundo Niella (2005), o envelope de Tricovab® contendo 40 g de conídios puros (correspondente a 2 kg de arroz + conídios) tem um custo final de R\$10,00. Considerando-se um envelope/ha em cada aplicação e o total de quatro aplicações no período chuvoso, de maio a agosto (R\$40,00/ha/ano), a aquisição do produto, a mão-de-obra (1,5 jornadas/ha) e os gastos (reparos e depreciação) com o pulverizador costal manual (20 l), o custo/ha/ano da aplicação de Tricovab® é de R\$157,45 ou aproximadamente 3,3 arrobas/ha/ano (Midlej R. R., Ceplac/Cepec/Sesoe, comunicação pessoal).

É importante salientar que agricultores, administradores rurais, cabos de turma e operários rurais devem procurar a Ceplac para receber treinamento na identificação da doença nas propriedades. As lavouras devem ser vistoriadas frequentemente no momento em que estiverem sendo realizadas as práticas de manejo como colheita, limpeza de galhos, desbrota entre outras. Ao visitar áreas infectadas por *Moniliophthora perniciosa*, deve-se tomar cuidado para não transportar partes de plantas doentes, como ramos, folhas ou frutos, as quais podem disseminar o patógeno em outras fazendas (Ceplac-ES, 2008).

## **Cronologia do Controle Biológico da Vassoura-de-Bruxa na Ceplac**

Os marcos históricos mais importantes das pesquisas sobre o controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacaueteiro conduzidas na Ceplac foram:

→ 1978 - início dos trabalhos pioneiros na Amazônia, Ceplac/Supor (C. N. Bastos);

→ 1981 - é encontrado no Pará o fungo *Cladobotryum amazonense* parasitando fungos Tricholomataceae, especialmente *Moniliophthora perniciosa* (Bastos *et al.*, 1981);



- 1982 - isolamento do fungo *Verticillium lamellicola* (F.E.V. Sm.) W. Gams, a partir de basidiomas de *Moniliophthora perniciosa* (Andebrhan, 1982);
- 1988 - experimento de campo com *Trichoderma stromaticum* na Amazônia utilizando vassouras no solo e penduradas em cacaueiros (Bastos, 1988);
- 1989 - constatação da vassoura-de-bruxa do cacaueiro na Bahia (Pereira *et al.*, 1989);
- 1991 - isolamentos de antagonistas a *Moniliophthora perniciosa* na Ceplac/Cepec (D. P. Oliveira);
- 1992 - início dos testes de antagonismo a *Moniliophthora perniciosa in vitro* e *in vivo* na Bahia (Costa & Bezerra, 1994);
- 1995 - primeiro experimento de campo com *Trichoderma stromaticum* na Bahia (Costa *et al.*, 1996);
- 1997 - a Ceplac inicia parcerias interinstitucionais com: I. S. Melo (Embrapa Meio Ambiente) e K. P. Hebbar, R. D. Lumsden & G. J. Samuels (USDA, EUA);
- 1998 - início da construção da Unidade de Biocontrole na Ceplac/Cepec, sob a coordenação de J. C. B. Costa;
- 1999 - inauguração da Unidade de Biocontrole na Ceplac/Cepec pelo Ministro de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Mapa, Francisco Sérgio Turra;
- 2000 - descrição da nova espécie *Trichoderma stromaticum* (Samuels *et al.*, 2000);
- 2000 - início dos estudos morfológicos e avaliação de risco ecotoxicológico de *Trichoderma stromaticum*, na Embrapa Meio Ambiente (I. S. Melo & V. L. S. Castro);
- 2000 - início da produção de Tricovab® para o controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro (Bezerra *et al.*, 2000);
- 2002 - teste de campo com nova formulação de *Trichoderma stromaticum* na Ceplac/Cepec (J. C. B. Costa & J. L. Veloso);
- 2003 - descrição do teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*, *Hypocrea stromatica* (Bezerra *et al.*, 2003);
- 2003 - realização da VIII Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos na Ceplac/Cepec, coordenada por J. L. Bezerra, J. C. B. Costa, E. D. M. N. Luz & S. D. V. M. Silva;
- 2004 - continuação do aprimoramento da produção massal de *Trichoderma stromaticum* para o controle da vassoura-de-bruxa do cacaueiro (G. R. Niella & O. Cordeiro);
- 2008 - obtenção da Licença Ambiental nº 54/08 concedida pela Prefeitura Municipal de Ilhéus, por meio da Secretaria de Meio Ambiente para a produção do biofungicida Tricovab® (*Trichoderma stromaticum*) pelo prazo de três anos.

## Considerações Finais

Desde o surgimento da doença na região cacaujeira da Bahia, em 1989, foram empregados esforços no sentido de encontrar uma solução para o problema. Com os ensaios realizados pela CEPLAC, o Brasil tornou-se referência no combate à vassoura-de-bruxa (Stadinik & Talamini, 2004).

Especificamente no que diz respeito ao controle biológico, as pesquisas avançaram dos experimentos básicos de laboratório e de casa-de-vegetação para as condições de campo. Dessa forma, os resultados obtidos e a necessidade de ampliação dos métodos de controle até então vigentes tornaram possível a construção da primeira unidade mundial de biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacaujeiro. O produto formulado (Tricovab<sup>®</sup>), após registro definitivo junto ao Mapa, permitirá a incorporação efetiva do método de controle biológico no manejo integrado da vassoura-de-bruxa, atendendo à constante procura dos cacaujeiros. Entretanto, apesar dos avanços obtidos, o caráter dinâmico da associação entre a grande diversidade morfológica e genética de *Trichoderma* spp., a descoberta do teleomorfo, *Hypocrea stromatica*, em vassouras secas de cacaujeiros (Bezerra et al., 2003), associada às variações dos agroecossistemas nas regiões cacaujeiras baianas, são exigidos estudos constantes para a manutenção da eficácia e da estabilidade do biofungicida, para consolidar esse método de controle.

## Agradecimentos

Os autores agradecem aos bolsistas, funcionários e pesquisadores da Ceplac/Cepec/Sefit pelo auxílio nos trabalhos de laboratório, campo e apoio técnico. Aos Drs. Cleber N. Bastos (Ceplac/Supor); Itamar S. Melo e Wagner Bettiol (Embrapa Meio Ambiente); K. P. Hebbar, R. D. Lumsden e G. J. Samuels (Agricultural Research Service/USDA) pela troca de experiência nas pesquisas em controle biológico da vassoura-de-bruxa. Ao Dr. Fábio G. Faleiro (Embrapa Cerrados) pelo apoio na execução das técnicas moleculares. Ao Dr. Eduardo Alves pelo suporte nos estudos de microscopia eletrônica (LME/DFP/Ufla). Ao Dr. Shinobu Sudo (*in memoriam*) pela contribuição e incentivo na implantação da Unidade de Biocontrole da Ceplac. Ao convênio Ceplac/Seagri/EBDA/Fundecau pelo apoio financeiro. A Dra Stela Dalva V. M. Silva e a Dra Edna Martins Newman Luz pela revisão do manuscrito. E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para tornar as pesquisas com o controle biológico da vassoura-de-bruxa uma realidade na região cacaujeira da Bahia.

## Referências

- Agriannual. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo. FNP Consultoria & Comércio. 2000.  
Agriannual. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo. FNP Consultoria & Comércio. 2008.  
Agrios, G.N. Plant Pathology. 5th Ed. Amsterdam. Academic Press. 2005.

- Aime, M.C. & Phillips-Mora, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. *Mycologia* 97: 1012-22. 2005.
- Almeida, H.A. & Luz, E.D.M.N. Influência da chuva, temperatura e umidade do ar na produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 20: 374. 1995. (Resumo).
- Alverson, W.S.; Whitlock, B.A.; Nyffeler R.; Bayer, C. & Baum, D.A. Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data. *American Journal of Botany* 86: 1474-1486. 1999.
- Andebrhan, T. *Verticillium lamellicola* (F.E.V. Sm.) W. Gams, um novo hiperparasita de basidiocarpos de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: CEPLAC-CEPEC (Ed.) Informe Técnico. Ilhéus BA. 1982. pp. 303-306.
- Andebrhan, T. Epidemiologia da vassoura-de-bruxa nos pólos cacaueiros da Amazônia brasileira. In: CEPLAC/DEPEA (Ed.) Informe de Pesquisa. Belém PA. 1985. pp. 36-66.
- Andebrhan, T. Rain water as a factor in the dissemination of basidiospores of *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer within cacao tree. Proceedings, X International Cocoa Conference, Santo Domingo. 1988. pp. 367-369.
- APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. The Linnean Society of London. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436. 2003.
- Baker, R.E.D. & Holliday, P. Witches' broom disease of cacao (*Marasmius pernicioso* (Stahel). Commonwealth Mycological Institute, Richmond. *Phytopathology Papers* 2. 1957.
- Bastos, C.N. Comparação morfológica de isolados de *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: CEPLAC/DEPEA (Ed.) Informe de Pesquisa. Belém PA. 1986. pp. 45-49.
- Bastos, C.N. Resultados preliminares sobre a eficácia de *Trichoderma viride* no controle da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacaueiro. *Fitopatologia Brasileira* 13: 340-342. 1988.
- Bastos, C.N. Epifitologia, hospedeiro e controle da vassoura-de-bruxa *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer. In: CEPLAC (Ed.) Boletim Técnico 168. Ilhéus BA. 1990. pp. 21.
- Bastos, C.N. *Trichoderma stromaticum* sp. nov. na produção de basidiomas e infecções de ramos e almofadas florais do cacaueiro por *Crinipellis pernicioso*. *Agrotropica* 12: 59-62. 2000.
- Bastos, C.N. & Albuquerque, P.S.B. Doenças fúngicas do cacaueiro na Amazônia brasileira. Belém PA. CEPLAC. Superintendência da Amazônia Oriental. 2006.
- Bastos, C.N. & Andebrhan, T. Urucum (*Bixa orellana*): nova espécie hospedeira de vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) do cacaueiro. *Fitopatologia Brasileira* 11: 963-965. 1986.
- Bastos, C.N. & Dias, J.C. Reduction in the production of basidiocarps of *Crinipellis pernicioso* by *Trichoderma viride*. *Summa Phytopathologica* 18: 235-238. 1992.
- Bastos, C.N. & Evans, H.C. A new pathotype of *Crinipellis pernicioso* (witches' broom disease) on solanaceous hosts. *Plant Pathology* 34: 306-312. 1985.
- Bastos, C.N.; Evans, H.C. & Samson, R.A. A new hyperparasite fungus *Cladobotrium amazonense*, with potential for control of fungal pathogens of cocoa. *Transactions of the British Mycological Society* 77: 273-278. 1981.
- Bastos, C.N.; Neil, S.J. & Horgan, R.A. metabolite from *Cladobotrium amazonense* with antibiotic activity. *Transactions of the British Mycological Society* 86: 571-578. 1986.
- Bastos, C.N.; Silva, S.D.V.M. & Almeida, O.C. Ocorrência de vassoura-de-bruxa em solanácea silvestre na região produtora de cacau da Bahia. *Agrotropica* 3: 109-110. 1991.
- Bastos, C.N.; Fonseca, S.E.A. & Melo, W.F. *Mascagnia cf sepium* cipó nativo da Amazônia brasileira hospedeiro de *Crinipellis pernicioso*. *Fitopatologia Brasileira* 23: 504. 1998.
- Bettiol, W. & Morandi, M.A.B.
- Bezerra, J.L. & Oliveira, M.L. Manejo de doenças do cacaueiro. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/semfaz/doencasdocacaueiro.htm>>. Acesso: em 30 out. 2008.
- Bezerra, J.L.; Costa, J.C.B.; Pomella, A.W.V. & Almeida, O.C. Como produzir Tricovab para controlar a vassoura-de-bruxa do cacaueiro. *Fitopatologia Brasileira* 25: 359. 2000. (Resumo).
- Bezerra, J.L.; Costa, J.C.B.; Bastos, C.N. & Faleiro, F.G. *Hypocrea stromatica* sp. novo teleomorfo de *Trichoderma stromaticum*. *Fitopatologia Brasileira* 28: 408-412. 2003.
- Bravo, E. & Hedger, J. Microflora associated "witches' broom" in cocoa and its potential role in the biological control of the pathogen *Crinipellis pernicioso*. Proceedings, X International Cocoa Conference, Santo Domingo. 1988. pp. 345-353.
- Comcauba, ACB. Boletins semanais de comercialização de cacau na Bahia. Salvador-Bahia. 2007.
- Ceplac-ES. Vassoura-de-bruxa: a praga. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/vassoura-de-bruxa.htm>>. Acesso em: 30 out. 2008.

- Chet, I. *Trichoderma*: Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In: Chet, I. (Ed.) *Innovative approaches to plant disease control*. New York. John Wiley. 1987. pp.137-160.
- Cook, R.J. & Baker, K.F. *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul. The American Phytopathological Society. 1983.
- Costa, J.C.B. & Bezerra, J.L. Antagonismo de isolados de *Cladosporium*, *Penicillium*, *Streptomyces* e *Trichoderma* sobre *Crinipellis pernicioso* na região cacauceira da Bahia. Anais, IV. Simpósio de Controle Biológico, Gramado. 1994. p. 59.
- Costa, J.C.B.; Bezerra, J.L. & Cazorla, I.M. Antagonismo de isolados de *Didymosphaeria*, *Gliocladium* e *Trichoderma* a *Crinipellis pernicioso* em condições de vassouzeiros na Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 20: 316. 1995. (Resumo).
- Costa, J.C.B.; Bezerra, J.L. & Cazorla, I.M. Controle biológico da vassoura-de-bruxa do cacauceiro na Bahia com *Trichoderma polysporum*. *Fitopatologia Brasileira* 21: 397. 1996. (Resumo).
- Costa, J.C.B.; Maffia, L.A.; Andebrhan, T. & Carvalho, A.L.P. Produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso* em diferentes fontes de inóculo na região Amazônica. *Fitopatologia Brasileira* 22: 507-512. 1997.
- Costa, J.C.B.; Bezerra, J.L.; Bastos, C.N. & Cazorla, I.M. Ação antagonista de *Trichoderma* sp. sobre a produção de *Crinipellis pernicioso* no estado da Bahia. Anais, VI. Simpósio de Controle Biológico, Rio de Janeiro. 1998. p. 89.
- Costa, J.C.B.; Bezerra, J.L. & Bastos, C.N. Ação antagonista de *Trichoderma stromaticum* sobre a produção de basidiomas de *Crinipellis pernicioso* no Estado da Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 25: 366. 2000. (Resumo).
- Costa, J.C.B.; Silva, S.D.V.M.; Melo, I.S. & Bezerra, J.L. Interação micelial de *Trichoderma stromaticum* e *Crinipellis pernicioso* em vassouras secas de cacauceiro. *Fitopatologia Brasileira* 26: 352. 2001. (Resumo).
- Costa, J.C.B.; Faleiro, F.G.; Faleiro, A.S.G.; Bezerra, J.L.; Bezerra, K.M.T.; Dantas-Neto, A. & Menezes, P.V. Diversidade genética de isolados de *Trichoderma* spp. e *Hypocrea stromatica* da região cacauceira do Brasil. Proceedings, XIV. International Cocoa Conference, Acra-Ghana. 2003. pp. 783-788.
- Evans, H.C. Witches' broom disease of Cocoa (*Crinipellis pernicioso*) in Ecuador. I. The Fungus. *Annals of Applied Biology* 89: 185-192. 1978.
- Evans, H.C. Witches' broom disease. A case study. *Cocoa Growers' Bulletin*. 32:5-9. 1981.
- Griffith, G.W. Witches' brooms and frosty pods: threats to world cacao production. *The Biologist* 51: 71-75. 2004.
- Harman, G. E.; Howell, C. R.; Viterbo, A.; Chet, I. & Lorito, M. *Trichoderma species* - opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2: 43-56. 2004a.
- Harman, G.E.; Petzoldt, R.; Comis, A. & Chen, J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94: 147-153. 2004b.
- Holliday, P. Witches' Broom of Cacao (*Marasmius perniciosus* Stahel). London. H. M. Stationery Office. 1952.
- Holliday, P. *Crinipellis pernicioso*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, 233. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 1970.
- Howell, C.R. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 92: 177-180. 2002.
- Kornerup, A. & Wanscher, J.H. *Methuen Handbook of Colour*. London. Eyre Methuen. 1983.
- Luz, E.D.M.N.; Machado, R.C.R. & Almeida, H.A. Períodos de incubação, secamento de vassouras, produção de basidioma e atividades de *Crinipellis pernicioso* em ramos e frutos de cacauzeiros na Bahia. *Fitopatologia Brasileira* 27: 341. 1994. (Resumo)
- Luz, E.D.M.N.; Bezerra, J.L.; Resende, M.L.V. & Oliveira, M.L. de. Cacau (*Theobroma cacao* L.) - controle de doenças. In: Valle, F.X.R. & Zambolim, L. (Eds.) *Controle de doenças de plantas: grandes culturas*. Vol. 2. Visconde do Rio Branco. Suprema. 1997. pp. 611-655.
- Melo, I.S. Potencialidade de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettioli, W. (Ed.) *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPMA. 1991. pp. 135-156.
- Melo, I.S. *Trichoderma* e *Gliocladium* como bioprotetores de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 4: 261-295. 1996.

- Melo, I.S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds.). Controle biológico. Vol. 1. Jaguariúna. EMBRAPA. 1998. pp. 17-68.
- Melo, I.S. & Faull, S. Scanning electron microscopy of conidia of *Trichoderma stromaticum*, a biocontrol agent of witches' broom disease of cocoa. Brazilian Journal of Microbiology 35: 330-332. 2004.
- Melo, I.S.; Sardagna, Nascimento, R.S. & Costa, J.C.B. Obtenção de mutantes de *Trichoderma stromaticum* resistentes ao benomil e antagonísticos a *Crinipellis pernicioso*. Anais, VII. Reunião de Controle Biológico de Fitopatógenos, Bento Gonçalves, RS. 2001. p. 89.
- McNeill, J.; Barrie, F.R.; Burdet, H.M.; Demoulin, V.; Hawksworth, D.L.; Marhold, K.; Nicolson, D.H.; Prado, J.; Silva, P.C.; Skog, J.E.; Wiersema, J.H. & Turland, N.J. (Ed.) International Code of Botanical Nomenclature: Vienna code. Vienna, v.146, 2006. Disponível em: <<http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>>. Acesso em: 29 out. 2008.
- Metcalfe, D.A.; Dennis, J.J.C. & Wilson, C.R. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. Plant Disease 88: 287-291. 2004.
- Monteiro, W.R. & Ahnert, D. Melhoramento genético do cacau. In: Valle, R.R. Ciência, tecnologia e manejo do cacau. 1ª Ed. Itabuna. Vital. 2007. pp. 189-198.
- Moore-Landecker, J. Fundamentals of the Fungi. 4th Ed. New Jersey. Prentice-Hall. 1996.
- Niella, G.R. Produção massal de *Trichoderma stromaticum* para o controle da vassoura-de-bruxa do cacau. Anais, IX. Simpósio de Controle Biológico. Recife. 2005. p. 45.
- Okabe, E.T.; Almeida, C.M.V.C.; Almeida, L.C. & Dias, L.A.S. Desempenho de clones de cacau em Ouro Preto do Oeste, Rondônia, Brasil. Bioscience Journal 20: 113-143. 2004.
- Oliveira, M.L. & Luz, E.D.M.N. Identificação e Manejo das Principais Doenças do Cacau no Brasil. 1ª Ed. Ilhéus. CEPLAC/CEPEC/SEFIT. 2005.
- Oliveira, M.L. & Luz, E.D.M.N. Identificação e manejo das principais doenças do cacau no Brasil. In: Valle, R.R. (Ed.) Ciência, tecnologia e manejo do cacau. 1ª Ed. Itabuna. Vital. 2007. pp. 123-188.
- Pereira, J.L. & Valle, R.R. Manejo integrado da vassoura-de-bruxa do cacau. In: Valle, R.R. (Ed.) Ciência, tecnologia e manejo do cacau. 1ª Ed. Itabuna. Vital. 2007. pp. 219-233.
- Pereira, J.L.; Ram, A.; Figueiredo, J.M. & Almeida, L.C.C. Primeira ocorrência da vassoura-de-bruxa na principal região produtora do Brasil. Agrotrópica 1: 79-81. 1989.
- Pomella, A.W.V.; Souza, J.T.; Macagnan, D. & Niella, G.R. Controle biológico das doenças do cacau. In: Valle, R.R. (Ed.) Ciência, tecnologia e manejo do cacau. 1ª Ed. Itabuna. Vital. 2007. pp. 189-198.
- Purdy, L.H. & Schmidt, R.A. Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management. Annual Review of Phytopathology 34: 573-594. 1996.
- QBCS. Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. London. ICCO. 33: 2. 2006/07.
- Resende, M.L.V.; Junqueira, N.T.V. & Dianese, J.C. *Crinipellis pernicioso* causando vassoura-de-bruxa em lobeira, *Solanum lycocarpum* no Distrito Federal e no Estado de Goiás. Fitopatologia Brasileira. 22: 301. 1997. (Resumo).
- Resende, M.L.V.; Niella, G.R.; Carvalho, G.A. & Silva, L.H.C.P. Comparação de diferentes técnicas para criopreservação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso*. Fitopatologia Brasileira 23: 266. 1998. (Resumo).
- Resende, M.L.; Nojosa, G.B.A.; Aguiar, M.G.; Silva, L.H.C.P.; Niella, G.R.; Carvalho, G.A.; Giovani, G.R. & Castro, R.M. *Crinipellis pernicioso* proveniente de um novo hospedeiro, *Heteropterys acutifolia*, é patogênico ao cacau. Fitopatologia Brasileira 25: 88-91. 2000.
- Rudgard, S.A. Interpreting the epidemiology of cocoa witches' broom for the better disease management in Rondonia, Brasil. Cocoa Browsers' Bulletin 28: 28-38. 1987.
- Rudgard, S.A. Detailed description of symptoms of witches' broom disease of cocoa caused by *Crinipellis pernicioso*. Cocoa Browsers' Bulletin 41. 1989.
- Rudgard, S.A.; Andebrhan, T.; Maddison, A.C. & Schmidt, R.A. Future prospects for improvement in disease management. In: Rudgard, S.A.; Maddison, A.C. & Andebrhan, T. (Eds.) Disease management in cocoa. London. Chapman & Hall, 1993. pp. 212-223.
- Samuels, G.J.; Pardo-Schultheiss, R.; Hebb, K.P.; Lumsden, R.D.; Bastos, C.N.; Costa, J.C.B. & Bezerra, J.L. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches' broom pathogen. Mycological Research 104: 760-764. 2000.
- Samuels, G.J.; Chaverri, P.; Farr, D.F. & Mccray, E.B. *Trichoderma* Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Disponível em: <<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>>. Acesso em: 9 jan. 2008.

- Silva, L.F. & Leite, J.O. Caracterização preliminar dos agrossistemas das regiões cacauceiras da Bahia e Espírito Santo. In: CEPLAC (Ed.) Boletim Técnico 156. Ilhéus BA. 1970. pp.15.
- Silva Neto, P.J. Sistema de produção de cacau para a Amazônia Brasileira. Belém. CEPLAC. 2001.
- Silva, S.D.V.M.; Gramacho, K.P. & Almeida, O.C. *Solanum paniculatum* hospedeiro de *Crinipellis perniciososa* na região sul da Bahia. *Agrotrópica* 4: 17-20. 1992.
- Silva, S.D.V.M.; Luz, E.D.M.N.; Almeida, O.C.; Gramacho, K.P. & Bezerra, J.L. Redescrição da sintomatologia causada por *Crinipellis perniciososa* em cacauceiro. *Agrotrópica* 14: 1-24. 2002.
- Singer, R. A monographic study of the genera *Crinipellis* and *Chaetocalathus*. *Lilloa* 8: 441-534. 1942.
- Souza, J.T.; Pomella, A.W.V.; Bowers, J.H.; Pirovani, C.P.; Loguercio, L.L. & Hebbbar, K.P. Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches'-broom pathogen. *Phytopathology* 96: 61-67. 2006.
- Stadinik, M.J. & Talamini, V. Legislação e uso de produtos fitossanitários naturais em países do cone sul. In: Stadinik, M.J. & Talamini, V. (Eds.) Manejo ecológico de doenças de plantas. Florianópolis. CCA/UFSC. 2004. pp. 63-82.
- Stahel, G. *Marasmius perniciosus* nov. spec., the cause of Krulloten disease of cocoa in Suriname. Paramarimbo. In: Dept. Van Den Landbouw (Ed.) Bulletin 33. Suriname. 1915. pp. 1-27.
- Thorold, C.A. Diseases of Cocoa. Oxford. Clarendon Press. 1975.
- Tovar, G. La escoba de bruja del cacao [*Crinipellis perniciososa* (Stahel) Singer]: descripción de síntomas de la enfermedad. *Agronomía Colombiana*. 8: 227-239. 1991.
- Tronsmo, A. & Hjeljord, L.G. Biological control with *Trichoderma* species. In: Boland, G.J. & Kuykendall, L.D. (Eds.) Plant-microbe interactions and biological control. New York. Marcel Dekker. 1998. pp. 111-126.
- Weindling, R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology* 22: 837-845. 1932.
- Wood, G.R.A. & Lass, R.A. Cocoa. 4<sup>th</sup> Ed. London. Longman. 1985.

## Capítulo 17

# Controle Biológico da Ferrugem do Cafeeiro

Luiz Antonio Maffia\*, Fernando Haddad  
& Eduardo S. G. Mizubuti\*

*Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, 36570-000  
Viçosa, MG, Brasil, e-mail: lamaffia@ufv.br; mizubuti@ufv.br. Bolsistas do CNPq.*

## Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de café (*Coffea* spp.), principalmente o do tipo arábica (*Coffea arabica*). O maior Estado produtor é Minas Gerais, onde se concentra em torno de 50% da produção nacional (Conab, 2008). Independentemente da espécie e da região produtora, a principal doença do cafeeiro no Brasil é a ferrugem, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix*. O controle da ferrugem baseia-se em aplicações de fungicidas (Zambolim *et al.*, 1997), em vista da dificuldade de se obter resistência durável à doença (Eskes, 1989).

Com a expansão da área cultivada e a introdução de novos sistemas de cultivo, o manejo alternativo de doenças assume papel relevante na cafeicultura. Por exemplo, nos sistemas orgânicos de produção há restrições quanto ao uso de agrotóxicos (Brasil, 1999). Em geral, nesses sistemas, o controle biológico de doenças é opção interessante no manejo de doenças (Harman, 2000), particularmente quando se consideram as exigências do mercado importador de café, cada vez mais preocupado com a segurança dos trabalhadores, consumidores e do ambiente (Caixeta, 2000; Caixeta & Pedini, 2002; van der Vossen, 2005).

Apesar da importância econômica da “commodity” e das demandas dos importadores, há carência de relatos de controle biológico de fitopatógenos do cafeeiro, efetivo em condições comerciais (Maffia *et al.*, 2008). No Brasil, o número de experiências de sucesso no biocontrole de pragas, como o da broca do cafeeiro, *Hypothenemus hampei* (Campanhola & Bettiol, 2003), é maior que no biocontrole de doenças. Nesse capítulo, serão relatados aspectos do biocontrole da ferrugem do cafeeiro, obtidos por meio de levantamento bibliográfico e por resultados de projetos de pesquisa conduzidos na Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro

Em revisão de literatura sobre controle biológico de doenças do cafeeiro, o maior número de trabalhos relaciona-se ao biocontrole da ferrugem, nos quais o hiperparasitismo, a antibiose e a indução de resistência foram os principais mecanismos de antagonismo (Maffia *et al.*, 2008). Provavelmente, as primeiras constatações de antagonismo no campo ocorreram com o hiperparasitismo por *Verticillium* spp., cujas estruturas brancas são facilmente observáveis em pústulas. Dentre as espécies de *Verticillium*, a mais comumente associada à ferrugem do cafeeiro é *Lecanicillium lecanii* (sin. *Verticillium lecanii*, *Verticillium hemileiae*), sobre a qual concentra-se a maioria dos trabalhos consultados: Leal & Villanueva, 1962; Garcia & Villanueva, 1965; Carrion, 1988; Shaw, 1988; Leguizamón *et al.*, 1989; Eskes *et al.*, 1991; Alarcón & Carrion, 1994; Vélez & Rosillo, 1995; Meza & Leguizamón, 1995; Rivas *et al.*, 1996; Gonzalez & Martinez, 1996, 1998; Vizcaino & Rodríguez, 1996; e Canjura-Saravia *et al.*, 2002. Apesar dos vários trabalhos, inclusive quanto à produção massal de *Verticillium* sp. (Canjura-Saravia *et al.*, 2002), o hiperparasitismo não é adotado comercialmente no biocontrole da ferrugem do cafeeiro em condições brasileiras, provavelmente em vista de resultados inconsistentes quanto à sua eficiência do biocontrole em condições comerciais.

Vários antagonistas a *Hemileia vastatrix* atuam produzindo substâncias antimicrobianas, principalmente antibióticos. Há evidências de que essas substâncias são produzidas por *Verticillium lecanii* (Saksirirat *et al.*, 1991) e *Beauveria bassiana* (Arboleda *et al.*, 2007). Porém, a maioria dos trabalhos relacionados à antibiose concentra-se em espécies de *Bacillus*: *Bacillus* sp. (Bravo, 1993), *Bacillus thuringiensis* (Cristancho, 1995) e, principalmente, *Bacillus subtilis* (Bettiol & Várzea, 1992; Marsiglio, 1993; Bettiol *et al.*, 1994).

Desde a década de 1970, investiga-se a indução de resistência de cafeeiros à ferrugem, e se avaliaram vários indutores: suspensão de uredinósporos termicamente inativados (Moraes *et al.*, 1976; Beretta *et al.*, 1977; Guzzo *et al.*, 1987); suspensões de esporos fúngicos ou de células bacterianas (Martins *et al.*, 1985); suspensão de *Saccharomyces cerevisiae* (Martins *et al.*, 1986); *Bacillus thuringiensis* ou produtos comerciais à base da bactéria (Cristancho, 1995; Roveratti *et al.*, 1989; Guzzo & Martins, 1996); e células de *Pseudomonas* spp. (Porrás *et al.*, 1999). Esses estudos intensificaram-se e há resultados promissores, inclusive com compostos orgânicos e/ou inorgânicos (Costa *et al.*, 2007). Uma linha de trabalho interessante é a avaliação de microrganismos residentes como indutores de resistência. Nesse sentido, Shiomi *et al.* (2006) isolaram bactérias endofíticas de folhas e ramos do cafeeiro, entre elas *Bacillus lentimorbus* e *Bacillus cereus*, as quais, segundo os autores, poderiam atuar por indução de resistência, além de antibiose e competição. Obteve-se, também, indução de resistência combinando-se fungos micorrízicos e isolados nativos de rizobactérias (*Azospirillum*, *Azotobacter*, *Phosphobacteria*, *Gluconacetobacter* e *Pseudomonas*) (Panneerselvam *et al.*, 2006). Considerando-se a eficiência de rizobactérias promotoras de crescimento em outras culturas (Teixeira *et al.*, 2005; Muleta *et al.*, 2007), iniciou-se, na UFV, a prospecção desses microrganismos visando ao controle da ferrugem. De 204 isolados de



bactérias obtidos do rizoplano e da rizosfera de cafeeiro, 30 reduziram a severidade da ferrugem em relação à testemunha e induziram o aumento da altura e da massa seca de mudas (Silva *et al.*, 2007).

Apesar dos avanços obtidos, o biocontrole da ferrugem ainda não é implementado comercialmente em condições de campo no Brasil. Há várias demandas e cuidados a serem atendidos para que o biocontrole seja realidade no sistema de produção do café (Maffia *et al.*, 2008). Talvez o mais importante seja a necessidade de maiores estudos de campo, onde as interações no “pentaedro” de doença (hospedeiro-patógeno-ambiente-antagonista-população residente) ocorrem, são modificadas pelo homem e precisam ser bem conhecidas. É importante também incluir o biocontrole no esquema de manejo integrado de pragas e doenças, estratégia já testada por Alves *et al.* (1998).

## Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro em Cultivo Orgânico

Observa-se uma tendência no mercado de produtos agrícolas, principalmente quanto ao nível de exigência dos consumidores, que se preocupam com a saúde, bem como com questões de caráter ambiental e social (Vieira & Carvalho, 2000; van der Vossen, 2005). Essa preocupação é notável quanto ao uso de agroquímicos. Na Europa e América do Norte, a área cultivada sem agrotóxicos está crescendo 30% ao ano, sendo que, no Brasil, o aumento anual atinge 10% (Caixeta, 2000). No contexto da cafeicultura, vários mercados consumidores importantes como os da Europa, América do Norte e Japão têm demandado os denominados cafés especiais, inclusive o orgânico.

A cafeicultura orgânica tem normas oficiais de produção, como a proibição de uso de agrotóxicos (Brasil, 1999). Em vista dessas restrições, inclusive quanto ao uso de produtos à base de cobre (Carvalho *et al.*, 2002), aliadas à dificuldade de se obter resistência durável à ferrugem, considera-se que o biocontrole seja alternativa para o manejo racional da ferrugem, mormente em cultivos orgânicos. Nesse contexto e em vista da inexistência de estudos de prospecção de microrganismos a serem usados em sistemas orgânicos de produção, iniciou-se um programa de pesquisa com base na hipótese de trabalho: “microrganismos que ocorrem naturalmente em cafezais orgânicos são efetivos em reduzir a intensidade da ferrugem”. O relato a seguir baseia-se em trabalho publicado por Haddad *et al.* (2007ab), em que se objetivou isolar microrganismos de cafeeiros cultivados organicamente, bem como testar a sua eficiência no controle de *Hemileia vastatrix*.

A partir de lavouras orgânicas da Zona da Mata, Triângulo Mineiro e do Sul de Minas Gerais, coletaram-se amostras de solo sob a copa de cafeeiros e de folhas (com ferrugem, sadias ou mortas). Desses materiais, obtiveram-se 154 isolados bacterianos (46 de folhas, 38 de restos e 70 do solo) e 239 fúngicos (73 de folhas, 69 de restos e 97 do solo). Em mudas com seis meses da variedade Catuaí, pulverizou-se suspensão de cada isolado fúngico ( $10^6$  esporos/ml) ou bacteriano ( $DO_{540}=0,2$ ) na face adaxial de folhas. Após 48 h em câmara úmida a 25 °C, inoculou-se *Hemileia vastatrix* nas plantas.

Após permanecerem 48 h adicionais em câmara úmida a 25 °C no escuro, as plantas foram mantidas em câmara de crescimento a 22° C e 12 h de fotoperíodo, determinando-se o período latente, frequência de infecção, número de urediniósporos produzidos por folha e germinação de esporos. Estimou-se a eficiência de cada isolado em reduzir essas variáveis, em relação à testemunha (pulverização de água e inoculação de *Hemileia vastatrix*). Nenhum isolado reduziu eficientemente o período latente ou a germinação dos esporos. Para 17 isolados (oito bacterianos e nove fúngicos), houve redução, superior a 70%, da frequência de infecção e do número de urediniósporos produzidos.

Em dois ensaios posteriores, em que se adotaram as mesmas condições de incubação e de câmara de crescimento do ensaio anterior, comparou-se a eficiência de cada um dos 17 isolados, quando aplicado em pré ou pós inoculação de *Hemileia vastatrix*. No primeiro ensaio, aplicou-se cada isolado ou o fungicida sulfato de cobre em folhas nos intervalos de 0, 4, 8, 12 ou 16 dias antes da inoculação do patógeno. No segundo ensaio, inoculou-se o patógeno e, após 0, 4, 8, 12 ou 16 dias, aplicou-se cada isolado ou o fungicida tebuconazol. Estimou-se a eficiência de cada tratamento em reduzir a frequência de infecção e o número de urediniósporos por folha. Os 17 isolados foram mais eficientes quando aplicados antes da inoculação de *Hemileia vastatrix*, porém a eficiência variou com os tempos de aplicação ( $P < 0,0001$ ), e foi menor quanto maior foi o intervalo entre a inoculação e o tratamento. Com sete isolados bacterianos, quando aplicados antes da inoculação, obtiveram-se as maiores reduções em ambas as variáveis (Tabela 1).

Posteriormente, avaliou-se a eficiência dos sete isolados em condições de campo. Para tal, montaram-se dois experimentos em uma lavoura orgânica comercial em Machado/MG, em delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições (uma unidade experimental=dez cafeeiros), em 2005 (Experimento 1) e 2005/2006 (Experimento 2). Em cada um, compararam-se nove tratamentos: os sete isolados bacterianos (células diluídas para  $DO_{540}=0,2$ ), hidróxido de cobre (0,88 g/planta) e água (testemunha).

**Tabela 1.** Eficiência dos isolados de *Bacillus* (B) e de *Pseudomonas* (P), aplicados aos 0, 4, 8, 12 e 16 dias antes da inoculação de *Hemileia vastatrix*, na redução da frequência de infecção (FI) e o número de urediniósporos do patógeno produzidos por folha (UF) de mudas de cafeeiros.

Tratamento	Redução da FI (%)					Redução do UF (%)				
	0*	4	8	12	16	0	4	8	12	16
CuSO <sub>4</sub>	99a**	98a	94a	93a	92a	100a	99a	99a	97a	97a
B157	100a	88a	90a	85a	84a	100a	92ab	96a	90ab	84a
P286	100a	98a	89a	82a	71a	100a	99a	97a	83ab	81a
B25	100a	97a	76a	79a	77a	100a	99a	91a	97a	93a
B10	99a	90a	84a	77a	85a	98a	88b	95a	93a	90a
B281	92a	92a	90a	75a	75a	98a	89ab	95a	83ab	88a
B175	99a	94a	86a	77a	68a	97a	98a	94a	79ab	83a
B205	96a	79a	81a	60a	58a	99a	89ab	85a	52b	39b

\*Dias antes da inoculação. \*\*Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Aplicou-se cada tratamento (0,4 l/planta) em três pulverizações mensais, que se iniciaram em janeiro/2005 (Experimento 1) ou em quatro pulverizações mensais, que se iniciaram em novembro 2005 (Experimento 2), seguindo-se o calendário do produtor. Mensalmente, avaliou-se a incidência da ferrugem em 60 folhas/repetição/tratamento, de janeiro/2005 a junho/2006. Com base nos valores da incidência de janeiro a maio de 2005 (Experimento 1) e de dezembro/2005 a junho/2006 (Experimento 2), estimaram-se os valores de incidência inicial ( $y_0$ ), incidência máxima ( $y_{max}$ ), incremento médio ( $y_{max}-y_0$ ) e área abaixo da curva de progresso da ferrugem (AACPF).

No Experimento 1, as pulverizações iniciaram-se em janeiro/2005, quando a incidência da ferrugem era superior a 15% (Tabela 2). As curvas de progresso da ferrugem tiveram tendência similar em todos os tratamentos, sendo que a incidência aumentou, atingiu o pico em maio e decresceu. Não houve efeito significativo dos isolados, apesar de haver tendência de alguns tratamentos em reduzir  $y_{max}$ ,  $y_{max}-y_0$  e AACPF (Tabela 2). Em novembro, as curvas de progresso foram similares para todos os tratamentos. A incidência atingiu 5% (limiar para controle químico da ferrugem) e as pulverizações para o Experimento 2 iniciaram-se. Os tratamentos não diferiram ( $P=0,72$ ) quanto à  $y_0$  (incidência em dezembro), mas diferiram ( $P<0,0001$ ) quanto a  $y_{max}$  (incidência em junho/2006),  $y_{max}-y_0$  e AACPF (Tabela 2). Em geral, menores valores das três variáveis ocorreram nas parcelas tratadas com hidróxido de cobre, com um isolado de *Bacillus* sp. e com o isolado de *Pseudomonas* sp.

Nesse estudo, obtiveram-se antagonistas eficientes a *Hemileia vastatrix*, a partir dos diferentes locais e materiais amostrados, como verificado por outros autores (Sultana *et al.*, 2000; Yuen *et al.*, 2001). No presente trabalho, os antagonistas potenciais a *Hemileia vastatrix* são originários de lavouras orgânicas, o que provavelmente seja vantajoso no estabelecimento em cafeeiros. Seis bactérias selecionadas foram *Bacillus* spp. e uma *Pseudomonas* sp., que podem ter diferentes mecanismos de antagonismo (Bettiol *et al.*, 1994; Porras *et al.*, 1999; Enebak & Carey, 2000; Raaijmakers *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2005).

**Tabela 2.** Incidência inicial ( $y_0$ ), incidência máxima ( $y_{max}$ ), incremento médio ( $y_{max}-y_0$ ) e área abaixo da curva de progresso da ferrugem (AACPF) em cafeeiros cultivados organicamente, em que se pulverizou *Bacillus* (B) e *Pseudomonas* (P), em dois experimentos (2005 e 2006).

Tratamento	$y_0$		$y_{max}$		$y_{max}-y_0$		AACPF	
	2005	2006	2005	2006	2005	2006	2005	2006
CuOH <sub>2</sub>	0,19a*	0,07a	0,46a	0,21c	0,27a	0,14d	19,88a	28,43d
B157	0,24a	0,05a	0,48a	0,28c	0,24a	0,23cd	18,00a	30,20cd
P286	0,27a	0,06a	0,37a	0,39b	0,10a	0,33bc	16,75a	35,24c
B25	0,25a	0,06a	0,52a	0,57a	0,27a	0,51a	20,00a	52,75b
B10	0,28a	0,06a	0,46a	0,50a	0,18a	0,44ab	19,63a	50,45b
B281	0,22a	0,06a	0,38a	0,53a	0,16a	0,47a	16,44a	52,01b
B175	0,31a	0,05a	0,41a	0,50a	0,10a	0,45a	17,87a	49,47b
B205	0,24a	0,06a	0,40a	0,54a	0,16a	0,48a	15,44a	52,25b
Água	0,20a	0,07a	0,64a	0,53a	0,44a	0,46a	19,81a	58,69a

\*Em cada coluna, médias seguidas da mesma letra não diferem entre si (Tukey,  $\alpha=0,05$ ).

Em condições controladas, a aplicação dos sete isolados protegeu cafeeiros contra a ferrugem por pelo menos 16 dias e, em condições de campo, por 30 dias. A pulverização de fungicidas para controle da ferrugem usualmente começa em novembro (início da estação chuvosa), quando a incidência é 5% (Zambolim *et al.*, 1997). No Experimento 1, as pulverizações iniciaram-se em janeiro, quando a incidência estava acima do limiar para pulverização. Assim, nenhum tratamento, mesmo o fungicida cúprico, controlou eficientemente a doença, apesar de  $y_{\max}$  (incidência em maio), incremento de janeiro a maio e a AACPF terem sido maiores na testemunha. No Experimento 2, dois isolados bacterianos foram tão eficientes quanto o fungicida cúprico em manter a incidência da doença em níveis baixos. Em outro experimento, montado em 2006/2007, em lavoura orgânica em Ervália/MG, a eficiência dos dois isolados, principalmente o de *Bacillus* sp., foi similar à do fungicida cúprico (dados não mostrados). Portanto, esses isolados são agentes potenciais de biocontrole da ferrugem no campo. Para implementação do biocontrole da ferrugem em condições comerciais, demanda-se ampliar o conhecimento disponível. Há evidências fortes de que ambos os isolados atuam por antibiose (Haddad *et al.*, 2007b), e estudos de autoecologia e de dinâmica populacional no campo encontram-se em andamento.

## Considerações Finais

Apesar do conhecimento acumulado, o controle biológico da ferrugem do cafeeiro ainda não é implementado em condições comerciais no Brasil. Há muitos resultados obtidos em condições controladas, mas “resultados obtidos em laboratório não podem ser transpostos para condições de casa-de-vegetação, e nem esses podem ser transpostos para o campo. A execução da sequência de ensaios – laboratório, casa-de-vegetação, campo – é processo longo e, não raro, desestimulante. Portanto, é comum pesquisadores iniciarem trabalhos de pesquisa, publicarem artigos científicos, mas não chegarem a um produto final que seja recomendável para uso comercial” (Maffia *et al.*, 2008). Apresentaram-se, também, resultados promissores obtidos no campo, e antevê-se que o biocontrole da ferrugem será realidade nos sistemas orgânico e convencional de produção de café. No primeiro devido às restrições ao uso de fungicidas, enquanto no segundo é imperativo reduzir o uso excessivo de agrotóxicos.

Quanto ao estudo de caso apresentado, conduzem-se trabalhos complementares para embasar melhor a implantação do biocontrole da ferrugem. Esses trabalhos priorizam elucidar aspectos relacionados à ecologia das bactérias antagonistas, como a dinâmica populacional e requerimentos microclimáticos, os quais poderão auxiliar a direcionar a estratégia para o biocontrole (Kinkel, 1997). Ademais, sem esses conhecimentos a cadeia laboratório-casa-de-vegetação-campo não se completará com sucesso. Demandam-se, também, estudos sobre a formulação dos agentes de biocontrole e sobre a obtenção de antagonistas que atuem por mais de um mecanismo, para aumentar a chance de sucesso do controle biológico (Bettiol, 1991; Guetsky *et al.*, 2002).

Como apontado quanto ao controle cultural (Mizubuti & Maffia, 2006), fatores econômicos, psicológicos, profissionais e educacionais podem afetar a implementação do controle biológico. Provavelmente, o mais importante seja o aspecto educacional de produtores que estarão envolvidos com a adoção de controle biológico (Guharay & Barrios, 2003; Segura *et al.*, 2004). Conhecer os níveis de conhecimento, de demanda e de expectativa desses atores e trabalhá-los adequadamente é crucial para sucesso da implantação do biocontrole.

## Agradecimentos

À Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) que financiaram os trabalhos de controle biológico da ferrugem do cafeeiro.

## Referências

- Alarcon, R. & Carrion, G. Uso de *Verticillium lecanii* en cafetales como control biológico de la roya del cafeto. *Fitopatología* 29: 82-85. 1994.
- Alves, S.B.; Almeida, J.E.M. & Salvo, S. Associação de produtos fitossanitários com *Beauveria bassiana* no controle da broca e ferrugem do cafeeiro. *Manejo Integrado de Plagas* 48: 19-24. 1998.
- Arboleda, V.J.W.; Valencia, J.A.; Ossa, O.G.A. & Gaitan, A.L. Antifungal activity of secondary metabolites from the biocontroller *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on orange coffee rust *Hemileia vastatrix*. *Bulletin OILB/SROP* 30: 159-162. 2007.
- Beretta, M.J.G.; Martins, E.M.F. & Moraes, W.B.C. Induced protection to *Hemileia vastatrix* at a distance from the site of inducing action in coffee plants. *Summa Phytopathologica* 3: 66-70. 1977.
- Bettiol, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: Bettiol, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA. 1991. pp. 33-35.
- Bettiol, W. & Várzea, V.M.P. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas. *Fitopatologia Brasileira* 17: 91-95. 1992.
- Bettiol, W.; Saito, M.L. & Brandão, M.S. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos à base de *Bacillus subtilis*. *Summa Phytopathologica* 20: 119-122. 1994.
- Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 7, de 17 de maio de 1999. Dispõe sobre a produção de produtos orgânicos vegetais e animais. LEX – Coletânea de Legislação e Jurisprudência: legislação federal e marginália 63: 2465-2476. 1999.
- Bravo, O.N. Efecto in vitro de *Bacillus* sp. sobre el crecimiento, esporulación y germinación de conidias e esporas de nueve hongos. *Fitopatología Colombiana* 17: 62-72. 1993.
- Caixeta, I.F. A produção de café orgânico: alternativa para o desenvolvimento sustentado - o exemplo do Sul de Minas. In: Zambolim, L. (Ed.) *Café, produtividade, qualidade e sustentabilidade*. Viçosa. UFV. 2000.
- Caixeta, G.Z.T. & Pedini, S. Comercialização de café orgânico. *Informe Agropecuário* 23: 149-152. 2002.
- Campanhola, C. & Bettiol, W. *Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário*. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003.
- Canjura-Saravia, E.M.; Sanchez-Garita, V.; Krauss, U. & Somarriba, E. Reproducción masiva de *Verticillium* sp., hiperparásito de la roya del café, *Hemileia vastatrix*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66: 13-19. 2002.

- Carrion, G. Estudios sobre el control biológico de la roya del café mediante *Verticillium lecanii* en Mexico. *Micología Neotropical Aplicada* 1: 79-86. 1988.
- Carvalho, V.L.; Cunha, R.L. & Chalfoun, S.M. Manejo ecológico das principais doenças do café. *Informe Agropecuário* 23: 101-114. 2002.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira Café safra 2008, terceira estimativa. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 30 out. 2008.
- Costa, M.J.N.; Zambolim, L. & Rodrigues, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do café. *Fitopatologia Brasileira* 32: 150-155. 2007.
- Cristancho, A.M.A. Efecto protector de la bacteria *Bacillus thuringiensis* en plantas de café contra el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. *Cenicafé* 46: 140-151. 1995.
- Enebak, S.A. & Carey, W.A. Evidence for induced systemic protection to fusiform rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Disease* 84: 306-308. 2000.
- Eskes, A.B. Resistance. In: Kushalappa, A.C. & Eskes, A.B. (Eds.) *Coffee rust: epidemiology, resistance, and management*. Boca Raton. CRC Press. 1989. pp. 171-292.
- Eskes, A.B.; Mendes, M.D.L. & Robbs, C.F. Laboratory and field studies on parasitism of *Hemileia vastatrix* with *Verticillium lecanii* and *V. leptobactrum*. *Cafe, The* 35: 275-282. 1991.
- Garcia, H. J. A. L. & Villanueva, J. R. Lysis of uredospore germ tubes of rust by species of *Verticillium*. *Phytopathology* 55: 40-42. 1965.
- Gonzalez, E. & Martinez, B. Efectividad in vitro de dos cepas de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas frente a *Hemileia vastatrix* Berk y Br. *Revista de Protección Vegetal* 11: 173-177. 1996.
- Gonzalez, E. & Martinez, B. Control biológico de la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk y Br.) con *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas. *Revista de Protección Vegetal* 13: 81-84. 1998.
- Guharay, F. & Barrios, M. Productores y productoras de café, aprendiendo y experimentando localmente para ajustar el manejo de plagas. *Boletín PROMECAFE* 98: 1217. 2003.
- Guzzo, S.D. & Martins, E.M.F. Local and systemic induction of beta 1,3 glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Phytopathology* 144: 449-454. 1996.
- Guzzo, S. D.; Martins, E.M.F.; Bach, E.E. & Moraes, W.B.C. Induced protection of coffee plants to *Hemileia vastatrix*. I. Partial purification of the extracellular inducer from heat-killed urediniospores of the pathogen. *Fitopatologia Brasileira* 12: 377-385. 1987.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y.; Fischer E. & Dinoor, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92: 976-985. 2002.
- Haddad, F.; Maffia, L.A.; Mizubuti, E.S.G.. & Teixeira, H. Biocontrol as an alternative for leaf rust management in organically grown coffee. *Bulletin OILB/SROP* 30: 93-96. 2007.
- Haddad, F.; Maffia, L.A.; Saraiva, R.M. & Mizubuti, E.S.G. Mecanismo de ação de bactérias antagonistas a *Hemileia vastatrix*. *Fitopatologia Brasileira* 32: S259. 2007. (Resumo).
- Harman, E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84: 377-393. 2000.
- Kinkel, L. L. Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 35: 327-347. 1997.
- Leal, A. & Villanueva, J.R. Digestión de uredosporas por *Verticillium hemileiae*. *Microbiologia Española* 15: 269-275. 1962.
- Leguizamón, C.J.E.; Vélez, A.P.E. & Gonzáles, S.A. Efecto de extratos metabólicos de *Verticillium lecanii* sobre *Hemileia vastatrix*. *Cenicafé* 40: 31-39. 1989.
- Maffia, L.A.; Mizubuti, E.S.G.. & Haddad F. Controle biológico de doenças do café. In: Núcleo de Estudos em Fitopatologia (Ed.) *Manejo fitossanitário da cultura do café*. Brasília. Sociedade Brasileira de Fitopatologia. 2008. pp. 37-48.
- Marsiglio, A.F. Isolamento e seleção de microrganismos antagonistas a alguns fungos fitopatogênicos do grupo ferrugens. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, SP. ESALQ/USP. 1993.
- Martins, E.M.F.; Beretta, M.J.G.; Roveratti, D.S. & Moraes, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. *Fitopatologia Brasileira* 10: 521-529. 1985.
- Martins, E.M.F.; Maria, A.C.; Grünewaldt-Stöcker, G.. & Moraes, W.B.C. Changes in the resistance of detached coffee leaves by yeast extract filtrate and heat treatment. *Fitopatologia Brasileira* 11: 899-909. 1986.

- Meza, C. P. & Leguizamón, J. Evaluación de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* Berliner y *Verticillium lecanii* Zimm (Viegas) en el control de la roya del café *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Fitopatología Colombiana 19: 50-56. 1995.
- Mizubuti, E.S.G. & Maffia, L.A. Introdução à Fitopatologia. Viçosa, Editora UFV. 2006.
- Moraes, W.B.C.; Martins, E.M.F.; Musemeci, M.R. & Beretta, M.J.G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. Summa Phytopathologica 2: 39-43. 1976.
- Muleta, D.; Assefa, F. & Granhall, U. In vitro antagonism of rhizobacteria isolated from *Coffea arabica* L. against emerging fungal coffee pathogens. Engineering in Life Sciences 7: 577-586. 2007.
- Panneerselvam, P.; Thangaraju, M. & Jayarama, A. Induction of defense mechanisms in coffee (*Coffea arabica* L.) against coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix* by native rhizobacterial isolates. Tropical Agricultural Research 18: 173-181. 2006.
- Porras, N.C.; Leguizamón, C.J.E. & Martínez, M.M. Inducción de resistencia por *Pseudomonas* spp., em plantas de café contra la roya del café *Hemileia vastatrix* Berk. Y Br. Ascolfi-Informa 25: 12-14. 1999.
- Raaijmakers, J. M.; Vlami M. & Souza J. T. Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. Antonie van Leeuwenhoek 81: 537-547. 2002.
- Rivas, Z.S.C.; Leguizamón, C.J.E. & Ponce, D.C.A. Estudio histológico, anatómico y morfológico de *Verticillium lecanii* y *Talaromyces wortmannii* con *Hemileia vastatrix*. Cenicafé 47: 16-31. 1996.
- Roveratti, D.S.; Teixeira, A.R.R. & Moraes, W.B.C. *Bacillus thuringiensis* a new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. Journal of Phytopathology 126: 149-159. 1989.
- Saksirirat, W. & Hoppe, H. Secretion of extracellular enzymes by *Verticillium psalliotae* Treschow and *Verticillium lecanii* (Zimm) Viégas during growth on uredospores of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd) in liquid cultures. Journal of Phytopathology 131: 161-173. 1991.
- Segura, H.R.; Barrera, J.F.; Morales, H. & Nazar, A. Farmers' perceptions, knowledge, and management of coffee pests and diseases and their natural enemies in Chiapas, Mexico. Journal of Economic Entomology 97: 1491-1499. 2004.
- Shaw, D.E. *Verticillium lecanii* a hyperparasite of the coffee rust pathogen in Papua New Guinea. Australasian Plant Pathology 17: 2-3. 1988.
- Shiomi, H.F.; Silva, H.S.A.; Melo, I.S.; Nunes, F.V. & Bettiol, W. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. Scientia Agrícola 63: 32-39. 2006.
- Silva, J.C.; Maffia, L.A.; Macedo, P.E.F.; Saraiva, R.M.; Haddad, F. & Mizubuti, E.S.G. Redução da severidade da ferrugem e aumento no crescimento de mudas de cafeeiro por possíveis isolados de rizobactérias. Fitopatologia Brasileira 32: S268. 2007. (Resumo).
- Sultana, K.; Batra, L.R.; Stavely, J.R. & Nasir, M.A. Hyperparasitism of *Verticillium lecanii* and *Cladosporium cladosporioides* on *Uromyces appendiculatus*, the causal organism for soybean rust. Pakistan Journal of Phytopathology 12: 42-45. 2000.
- Teixeira, D.A.; Alfenas, A.C.; Maffia, R.C.; Maffia, L.A. & Ferreira, E.M. Evidências de indução sistêmica à ferrugem do eucalipto mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. Fitopatologia Brasileira 30: 350-356. 2005.
- van der Vossen, H. A. M. A critical analysis of the agronomic and economic sustainability of organic coffee production. Experimental Agriculture 41: 449-473. 2005.
- Vélez, A.P.E. & Rosillo, G.A.G. Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix* en condiciones de invernadero y de campo. Cenicafé 46: 45-55. 1995.
- Vieira, M. & Carvalho, G. Perspectivas para cafés no Brasil. In: Zambolim L. (Ed.) Café, produtividade, qualidade e sustentabilidade. Viçosa. UFV. 2000.
- Vizcaino, A.M. & Rodriguez, R.P. Uso de discos de hojas de café para identificar organismos con potencial de biocontrol. Journal of the Agricultural University of Puerto Rico 80: 81-84. 1996.
- Yuen, G.Y.; Steadman, J.R.; Lindgren, D.T.; Schaff, D. & Jochum, C. Bean rust biological control using bacterial agents. Crop Protection 20: 395-402. 2001.
- Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Pereira, A.A. & Chaves, G.M. Café. In: Zambolim, L. & Vale, F.X.R. (Eds.) Controle de doenças de plantas: grandes culturas. Viçosa. UFV. 1997. pp. 83-94.

## Capítulo 18

# Microrganismos Endofíticos como Agentes de Biocontrole da Ferrugem do Cafeeiro e de Promoção de Crescimento

Harllen S. A. Silva<sup>1</sup> & Wagner Bettiol<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. CP 007, 44380.000, Cruz das Almas, BA, Brasil, e-mail: harllen@cnpmf.embrapa.br. <sup>2</sup>Embrapa Meio Ambiente, CP 69. 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: bettiol@cnpma.embrapa.br. \*Bolsista do CNPq.

## Introdução

Os primeiros relatos da presença de fungos e bactérias no interior de tecidos de plantas datam do final do século XIX. Mundt & Hinkle (1976) citam que um pesquisador chamado Fernbach, em 1888, detectou a presença de células bacterianas no interior de tecidos de tomate, cenoura e beterraba açucareira. Segundo Vogl, citado por White Jr. *et al.* (1996), em 1898 foi detectado um fungo endofítico em sementes de *Lolium temulentum*.

Nas últimas duas décadas a pesquisa tem focado os benefícios que a aplicação dos endófitas nas plantas pode gerar, como o aumento na produção e redução da severidade de várias doenças. Considerada a potencialidade de organismos endofíticos como agentes de biocontrole e de promoção de crescimento de plantas, o interesse neste tipo de estudo aumentou consideravelmente. Também há estudos sobre a biodiversidade e plantas servindo como reservatório de material genético, abrigando microrganismos endofíticos (Bacon & White, 2000; Chen *et al.*, 1995; Clay, 1990; Kowalski & Sadlovski, 1993; McInroy & Kloepper, 1995a).

Conceitualmente, são considerados microrganismos endofíticos, incluindo bactérias e fungos, aqueles que colonizam os tecidos internos das plantas por todo seu ciclo de vida ou parte dele, e sem causar danos aparentes (Wilson, 1995). Os microrganismos endofíticos são originados de comunidades epifíticas da filosfera e da rizosfera, podendo ser encontrados não apenas nas partes aéreas dos vegetais, mas também em raízes que são sua principal porta de entrada (Beattie & Lindow, 1995; Adams & Kloepper, 1996; Dong *et al.*, 1994). Uma vez estabelecidos dentro dos tecidos, microrganismos endofíticos podem ser transmitidos pela propagação vegetativa da planta por sucessivas gerações (Dong *et al.*, 1994).



A capacidade desses microrganismos colonizarem os tecidos internos das plantas lhes confere uma vantagem ecológica sobre espécies que colonizam as plantas epifiticamente. Os tecidos internos das plantas proporcionam um ambiente com maior proteção para os endófitas, diferentemente da superfície, onde são expostos a variações ambientais extremas como temperatura, radiação ultravioleta e competição com outros microrganismos (Hallmann *et al.*, 1997).

É provável que toda planta, potencialmente, abrigue microrganismos endofíticos em seus tecidos. Desta íntima associação, muitas vezes mutualística, é que fez surgir a hipótese de que os endófitas podem exercer efeitos benéficos nos seus hospedeiros, como promoção de crescimento e controle de fitopatógenos.

Entre os microrganismos encontrados em associação endofítica com plantas, incluem-se fungos (Schardl & Phillips, 1997), nematóides e micoplasmas (Hallmann *et al.*, 1997; Musson, 1994) entre outros. A maioria dos fungos endofíticos é biotrófico mutualista (Bacon *et al.*, 1997), e os mais comuns pertencem aos gêneros *Neotyphodium*, *Balansia*, *Epichloe* e *Myriogenospora*. Entretanto, as bactérias são as mais frequentes. De maneira geral, o grupo mais comum de bactérias endofíticas isoladas de tecidos vegetais é composto pelos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Agrobacterium* (Hallmann *et al.*, 1997; Hallmann, 2001).

Os microrganismos endofíticos podem beneficiar as plantas diretamente, promovendo o crescimento e indiretamente, reduzindo a severidade do ataque de patógenos. Há vários mecanismos descritos sobre como endófitas promovem o crescimento dos vegetais que os abrigam. A fixação de N<sub>2</sub> atmosférico, a produção de fitormônios ou análogos e a disponibilização de nutrientes, como a solubilização de fósforo e a mineralização da matéria orgânica são exemplos clássicos na literatura. A atuação como agentes de biocontrole de fitopatógenos pode ser resultante de competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira (Schardl & Phillips, 1997), produção de compostos antimicrobianos (Strobel, 2002) e indução de resistência sistêmica (van Loon *et al.*, 1998).

Considerando as características benéficas inerentes aos microrganismos endofíticos foram realizados trabalhos visando selecionar bactérias e/ou fungos endofíticos do cafeeiro com potencial de controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) e de promoção de crescimento de mudas. Também foram realizados estudos para elucidar possíveis mecanismos de ação envolvidos, tanto no controle da ferrugem quanto na promoção de crescimento. Os endófitas que se destacaram nos ensaios foram identificados pela análise do perfil de ácidos graxos (MIDI Sherlock Versão 6.1, Método TSBA 50, Newark, DE, USA) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Espécies de isolados endofíticos empregados nos ensaios.

Endófitas	Espécie
3F	<i>Brevibacillus choschinensis</i>
109G	<i>Bacillus megaterium</i>
115G	<i>Microbaterium testaceum</i>
116G	<i>Bacillus megaterium</i>
119G	<i>Cedecea davisae</i>
150G	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>

## Prospecção de Microrganismos Endofíticos com Potencial para o Controle da Ferrugem do Cafeeiro

Um dos desafios para o uso de microrganismos endofíticos na agricultura como agentes de controle de doenças e promotores de crescimento e aumento da produção, talvez seja o de encontrar um endófito capaz de atuar consistentemente em condições de produção comercial. Segundo Chen *et al.* (1996), o número de microrganismos benéficos no planeta está em torno de 1 a 2 % do total da população. Em vista disso, a procura por tais microrganismos é árdua e requer que se trabalhe com grande número de indivíduos nos testes de seleção para aumentar as chances de sucesso. Faz-se necessário a realização de ensaios em condições controladas, que tornem possível a manipulação de grande número de isolados com dispêndio de pouco espaço físico (Guetsky *et al.*, 2002). Nos estudos foram utilizadas bactérias e fungos endofíticos da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Ambiental, da Embrapa Meio Ambiente, obtidos de folhas, raízes e galhos de *Coffea arabica* e *Coffea robusta*.

Em discos de folhas de café 'Mundo Novo' foram testados 234 isolados endofíticos (17 fungos e 217 bactérias) quanto à interferência na ferrugem do cafeeiro. O desempenho dos endófitas quanto ao controle da ferrugem em discos seguiu a distribuição normal, com a maioria dos isolados dentro da faixa que compreendeu 60% de controle até 120% de incremento da doença em relação à testemunha, ou seja, um número de isolados aumentou a predisposição dos discos ao ataque do patógeno. Alguns endófitas aumentaram a severidade da ferrugem em até 378% em relação à testemunha. Tal fato também foi constatado por Shiomi *et al.* (2006), que ao selecionar bactérias endofíticas para controle da ferrugem, encontrou isolados que predispunham os discos à ferrugem. Esses testes apontaram o isolado da bactéria endofítica 64R como o de melhor desempenho, proporcionando 100% de controle do patógeno, e o isolado 137G, com nível de controle de 97%, quando aplicados 24 e 72 h antes da inoculação do patógeno, respectivamente. Os isolados 3F, 14F, 36F, 109G, 115G, 116G e 119G proporcionaram satisfatórios índices de controle quando aplicados 72 e 24 h antes da inoculação do patógeno.

A aplicação antes do patógeno (24 e 72 h) garantiu aos antagonistas uma vantagem adaptativa de colonização tanto de forma endofítica quanto epifítica, uma vez que microrganismos endofíticos podem ter origem em comunidades epifíticas da filosfera (Beattie & Lindow, 1995; Dong *et al.*, 1994). Além disso, aumenta a possibilidade de ocorrer indução de resistência sistêmica por sensitivação dos tecidos, a competição por espaço e nutrientes na superfície do disco, a inibição da germinação dos uredíniosporos ou ainda lise de estruturas do patógeno. Isto indica porque poucos endófitas apresentaram bom desempenho nos intervalos onde foram aplicados concomitantemente ou após o patógeno, inclusive com nenhum diferindo da testemunha (Glick & Bashan, 1997).

Os isolados 116G, 123G, 36F, 137G, 14F, 109G, 115G, 3F e 119G de bactérias endofíticas selecionadas nos discos de folhas de cafeeiro foram testados em mudas de cafeeiro, em três intervalos de aplicação, 72 e 24 h antes do patógeno, e simultaneamente.

As mudas, após a aplicação dos endófitas e inoculação, foram mantidas em telado e procedeu-se à contagem do número de pústulas e “flecks” por folha aos 25 dias após a inoculação. Os melhores níveis de controle foram obtidos quando os antagonistas foram aplicados 72 h antes da inoculação de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*. Destacaram-se os isolados 137G, 14F, 109G, 115G, 3F e 119G, em ordem crescente de eficiência na redução dos sintomas da doença (Tabela 2). O isolado endofítico 3F confirmou sua característica de promissor agente de biocontrole da ferrugem proporcionando redução da severidade da ferrugem em torno de 85%. Adicionalmente, devem ser considerados os isolados 14F e 115G que proporcionaram bons índices de controle no teste em mudas de cafeeiro, assim como no teste em discos de folhas. Embora não tenha se destacado no teste anterior, a bactéria endofítica 119G foi a mais eficaz no teste em mudas, proporcionando o menor número de lesões por folha. Por outro lado, os isolados 116G e 36F anteriormente selecionados como bons agentes de controle da ferrugem, não repetiram os resultados.

Estes resultados podem ser explicados considerando as diferenças existentes entre os testes realizados com discos de folhas e em mudas, no que se refere às condições de ambiente em que os endófitas atuaram. Nos testes em discos de folhas as variáveis climáticas (luz, temperatura e umidade) foram controladas, o que facilitou o estabelecimento dos antagonistas. Já no ensaio com as mudas, a exposição às variações de temperatura e umidade, principalmente, foi um desafio a mais para as bactérias endofíticas colonizarem o filoplano e os tecidos internos.

Testes que buscam a seleção de agentes de biocontrole normalmente começam com centenas de isolados. O grande número de microrganismos testado torna a realização dos ensaios de seleção nas condições ecológicas de uso dos agentes de biocontrole operacionalmente inviável, em virtude dos custos de instalação, mão-de-obra, espaço e tempo (Weller *et al.*, 1985; Kloepper *et al.*, 1988). Deste modo, procura-se realizar a seleção por meio de bioensaios simplificados, em condições controladas, que minimizem as variações ambientais e que na maioria das vezes favorecem aos antagonistas (Whipps, 1997). Esta situação influencia diretamente na eficácia dos agentes de biocontrole em testes *in vivo*, o que pode explicar o fato da não reprodutibilidade de resultados dos isolados 116G e 36F, que selecionados nos testes em discos de folhas não repetiram a atuação no ensaio com mudas.

**Tabela 2.** Severidade da ferrugem do cafeeiro (número de lesões por folha) em mudas tratadas com bactérias endofíticas 72 e 24 h antes e simultaneamente à inoculação do patógeno.

Endófito	72 h antes	24 h antes	Simultaneamente
Controle	2,47 a*	2,21 a	2,56 ab
116G	1,41 ab	1,02 a	1,14 ab
123G	1,14 ab	3,31 a	2,03 ab
36F	1,02 ab	2,16 a	1,46 ab
137G	0,94 b	2,24 a	3,18 a
14F	0,91 b	3,24 a	2,57 ab
109G	0,84 b	0,60 a	2,08 ab
115G	0,77 b	1,73 a	2,58 ab
3F	0,39 b	2,67 a	1,25 ab
119G	0,27 b	1,48 a	2,08 ab

\* Valores seguidos de mesma letra nas colunas não diferem pelo teste Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Apesar de reduções no número de lesões por folha ao se aplicar os endófitas 24 h antes e concomitante ao patógeno, não houve diferença entre os tratamentos e o controle (Tabela 2). Para alguns isolados de endófitas a severidade foi maior do que no tratamento controle.

Os melhores índices de controle foram obtidos quando os endófitas foram aplicados 72 h antes do patógeno. Este intervalo garantiu aos antagonistas uma vantagem de adaptação, pois houve tempo para a possível colonização epifítica, bem como dos sítios de infecção (Hallmann *et al.*, 1997). Uma vez na folha pré-colonizada com a bactéria endofítica, os uredíniosporos de *Hemileia vastatrix* tiveram primeiro que lidar com a presença de prováveis substâncias antimicrobianas secretadas com propriedades de inibir sua germinação. Ainda, se germinados, o fungo encontraria a competição por espaço e sítios de infecção, no caso os estômatos (Godoy *et al.*, 1997; Levy & Carmeli, 1995; Hallmann *et al.*, 1997).

Como verificado no teste em discos de folhas, alguns isolados bacterianos aumentaram a severidade da doença também em mudas, como é o caso dos isolados 123G, 14F, 3F e 137G, quando aplicados 24 h antes do patógeno, e dos isolados 137G, 115G e 14F quando aplicados concomitantemente ao patógeno. Há de se lembrar que a relação entre o endofítico e seu hospedeiro é variável podendo, por diversos fatores, deixar de ser simbiótica ou mutualística, se tornando saprofítica ou oportunística, nesse caso fitopatogênica, conforme revela Strobel & Daisy (2003). Da mesma forma que nos discos, apesar de se verificarem reduções no número de lesões por folha ao se aplicar os endófitas 24 h antes e concomitante ao patógeno em mudas, estatisticamente não houve diferença entre os isolados e a testemunha.

Para investigar a hipótese de indução de resistência sistêmica, foi realizado um ensaio para detecção do aumento da atividade de enzimas relacionadas à defesa da planta. Para isso, avaliaram-se os níveis de peroxidase (Hammerschmidt *et al.*, 1982), lipoxigenase (Axelrod *et al.* 1981) e fenilalanina amônia-liase (Pascholati *et al.* 1986), em mudas tratadas com os isolados 3F, 109G, 115G e 119G, aos sete dias após a inoculação do patógeno. As análises foram feitas em folhas diferentes daquelas onde o endófito e o patógeno foram aplicados, para avaliar se houve sistemicidade da indução de resistência. Houve aumento significativo da atividade de peroxidase em plantas tratadas com os isolados 3F e 119G. Não se detectaram aumentos nos níveis das outras enzimas, mesmo para os demais isolados (Silva *et al.*, 2008). A escolha de uma data fixa, sete dias após a inoculação, para a coleta do material vegetal e a análise da presença das enzimas pode ter contribuído para a não detecção do aumento da atividade de fenilalanina amônia-liase e lipoxigenase, e a favor da atividade da peroxidase. Bhattacharya & Ward (1988) reportam que na fase de estabelecimento de um patógeno nos tecidos do hospedeiro geralmente aumenta a atividade de fenilalanina amônia-liase. Ainda, segundo Podile & Laxmi (1998), os maiores níveis de atividade desta enzima acontecem em torno de 24 h após o início da infecção. Deste modo, não se descarta a possibilidade de ter havido picos de atividade de fenilalanina amônia-liase nos dois primeiros dias após a inoculação. Já o aumento da atividade de peroxidase geralmente está associado com estádios mais tardios do processo de infecção (Hammerschmidt *et al.*, 1982). Os resultados de atividade de peroxidase estão de acordo com o Podile & Laxmi (1998), que verificaram aumento nos níveis da enzima em plantas de ervilhaca tratadas com *Bacillus subtilis*, com ponto ótimo aos sete dias após inoculá-las com *Fusarium udum*.

A ausência de aumento significativo nos níveis enzimáticos para os isolados 109G e 115G sugere que tais isolados podem estar atuando contra a ferrugem por outros mecanismos de controle, tais como inibição da germinação dos uredíniosporos ou lise das estruturas do patógeno. Realizou-se então um teste de inibição da germinação dos uredíniosporos com os isolados 109G, 115G, 119G e 3F, em lâminas de microscopia, sendo observada redução significativa da germinação, comparados à testemunha (em torno de 40%). Provavelmente, a produção de substâncias antimicrobianas seja uma característica destes isolados, mas ainda precisa ser comprovado com testes adicionais.

Há vários relatos de bactérias endofíticas exercendo atividade inibitória contra fitopatógenos (Levy & Carmeli, 1995; Wilhelm *et al.*, 1998). Trabalhando com *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raça 4 e a endófito *Burkholderia cepacia* isolada de aspargo, Pan *et al.* (1997) realizaram estudos por microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Os autores observaram que a endófito colonizou a superfície de hifas e de macroconídios do patógeno, ocasionando deformação de micélio, com espessamentos terminais e intercalares em hifas. Existe a possibilidade de ter havido também esse efeito do isolado 3F sobre os uredíniosporos de ferrugem, além da produção de inibidores da germinação, uma vez que Shiomí *et al.* (2006) verificaram a ocorrência de deformações em tubos germinativos de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix* tratados com bactérias endofíticas.

## **Prospecção de Microrganismos Endofíticos com Potencial para Promoção do Crescimento de Mudanças de Cafeeiro**

Os mesmos endófitos empregados nos ensaios de controle da ferrugem foram testados quanto à capacidade de promoverem o crescimento de mudas de cafeeiro. Para isso, sementes de cafeeiro (cv. Mundo Novo) foram microbiolizadas por 24 h com suspensão de propágulos dos microrganismos endofíticos em fase exponencial de crescimento e a seguir semeadas em sacos plásticos (0,5 l) contendo solo não esterilizado, que permaneceram em telado por 180 dias. Transcorrido esse período foram determinados a altura das plantas, número de folhas e peso da matéria seca do sistema radicular e da parte aérea.

Do total de isolados testados, 109 endófitos proporcionaram índices de promoção de crescimento superiores à testemunha. Porém, pelo teste de agrupamento de Scott-Knott seis isolados de bactérias endofíticas (85G, 161G, 163G, 160G, 150G e 109G) diferiram da testemunha. Os demais isolados testados não demonstraram características de promoção de crescimento e alguns inibiram o crescimento. Isso pode ser explicado pelo fato que bactérias endofíticas podem estimular o crescimento de plantas em um estágio de desenvolvimento e inibir em outro (Sturz *et al.*, 2000).

Bactérias endofíticas têm sido associadas à promoção de crescimento em diversas culturas não perenes, como tomate, alface, batata e milho (Bashan *et al.*, 1989; Frommel *et al.*, 1991; Hinton & Bacon, 1995). Raros são os trabalhos envolvendo endofítia e promoção de crescimento em plantas perenes, particularmente em cafeeiro. Porém, alguns pesquisadores afirmam que endófitas podem atuar como eficientes microrganismos promotores de crescimento, talvez de modo semelhante às rizobactérias como pela produção de hormônios e fatores de crescimento (Musson, 1994).

Neste caso deve-se considerar que os microrganismos endofíticos foram aplicados por tratamento de sementes. O processo de germinação libera grandes quantidades de metabólitos na forma de exsudatos e, desta forma, os microrganismos aplicados na semente têm oportunidade de serem os primeiros a utilizar estes substratos e com isso aumentam suas chances de estabelecimento (Stirling, 1991). Porém, sementes de cafeeiro têm germinação lenta, 30-40 dias geralmente, o que faz com que a liberação das substâncias que serviriam como fonte de carbono e nitrogênio para os endófitas seja lenta. Além disso, precisa ser considerado que microrganismos endofíticos ocupam um nicho bastante específico e não se estabelecem facilmente na rizosfera (Hallmann *et al.*, 1997). Estes podem ter sido os maiores obstáculos para as bactérias endofíticas testadas, o que explicaria o baixo número de isolados eficientes na promoção do crescimento.

Na tentativa de elucidar os mecanismos de promoção de crescimento envolvidos, os isolados 85G, 161G, 163G, 160G, 150G e 109G, que se destacaram como promotores do crescimento, foram analisados quanto à capacidade *in vitro* de produzirem fosfatase, sideróforos, ácido indol acético (AIA), citocininas e giberelinas (Cattelan, 1999). Todos os isolados apresentaram resultado positivo para pelo menos um dos testes, exceção feita ao 150G (Tabela 3). O destaque foi o isolado 85G, capaz de produzir sideróforos e ácido indol acético. Essa característica faz desse isolado promissor para aplicação tanto no sistema radicular quanto na parte aérea, uma vez que a produção de sideróforos disponibilizaria ferro para as raízes, enquanto o ácido indol acético atuaria diretamente na parte aérea.

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento de plantas por microrganismos endófitas e também habitantes da rizosfera ou epifíticos são discutidos por Frommel *et al.* (1991); Kloepper *et al.* (1991) e Holland (1997). Além dos mecanismos estudados neste trabalho, a literatura inclui a mineralização da matéria orgânica do solo, alteração na permeabilidade das raízes, fixação de nitrogênio atmosférico e o próprio efeito indireto de estímulo ao crescimento pelo biocontrole de pragas e doenças (Sumner, 1990; Kloepper, 1993; Glick & Bashan, 1997). É possível que o isolado 150G esteja atuando por um destes mecanismos que não foram estudados.

Embora isoladas de galhos de cafeeiro, ou seja, da parte aérea, as endófitas 85G, 163G, 160G e 161G produziram sideróforo e fosfatase, respectivamente, substâncias que teoricamente teriam maior utilidade num ambiente de rizosfera. Está envolvida nesta questão a origem dos microrganismos colonizando os vegetais. Se endófitas colonizam tecidos internos de plantas vivas, neles se multiplicando e sobrevivendo, por alguma via a penetração ocorreu, seja uma abertura natural ou um ferimento.

**Tabela 3.** Mecanismos de promoção de crescimento dos endófitas selecionados.

Endófito	Fosfatase	Sideróforo	AIA	Citocinina/Giberelina
85G	-	+	+	-
161G	+	-	-	-
163G	-	+	-	-
160G	+	-	-	-
150G	-	-	-	-
109G	-	-	+	-

A maioria dos trabalhos reporta a rizosfera como a principal fonte de microrganismos endofíticos (Verma *et al.*, 2001; McInroy & Kloepper, 1995b; Shishido *et al.*, 1999). Isso foi confirmado pelo trabalho de De Boer & Copeman (1974) que plantaram mudas axênicas de batata no campo e isolaram espécies saprófitas delas após algumas semanas. Segundo Hinton & Bacon (1995), o caminho mais lógico para a colonização dos tecidos por microrganismos endófitas parece começar com a migração da bactéria ou fungo para locais onde sementes estejam germinando ou raízes crescendo. Isso pode explicar a presença nas bactérias da característica de produção de enzimas de degradação de fosfatos e moléculas quelantes de ferro.

Estudos de outros mecanismos de promoção de crescimento, como os citados, poderiam aumentar o conhecimento sobre a capacidade das bactérias endofíticas selecionadas em promover o crescimento de mudas de café.

## Considerações Finais

Os estudos futuros com microrganismos endofíticos para fins agrônômicos devem focar principalmente a parte ecológica e interações com outros microrganismos, aplicação dos endófitas e/ou movimento nos tecidos das plantas. A literatura reporta que endófitas não atuam sozinhas ou apenas ao nível de seu hospedeiro, e sim numa complexa rede de interações com a microbiota nativa e com o metabolismo vegetal. Embora estudados separadamente neste trabalho, nada impede que os mecanismos de controle possam atuar simultaneamente, aumentando a capacidade de controle do endófito.

O emprego de misturas de isolados benéficos é outro ponto pouco explorado, mesmo porque pesquisas com endófitas são relativamente recentes. Desenvolvimento de formulações contendo microrganismos endofíticos como agentes ativos de controle de doenças e/ou promoção de crescimento é outro ponto a ser buscado. Isso facilitaria a integração do uso destes agentes na rotina agrícola.

Com relação à seleção realizada, constatou-se que não houve correspondência entre os melhores isolados com características de promoção de crescimento e os isolados mais promissores como agentes de biocontrole da ferrugem. Tais resultados fornecem subsídio experimental ao conceito estabelecido por Bashan & Holguin (1997) de que a promoção de crescimento e o controle de patógenos em

plantas podem não ser características simultâneas de um mesmo antagonista. Lazarovits & Nowak (1997) levantam as possibilidades de insucessos em programas de seleção de antagonistas com base somente em um critério desejável.

Talvez a principal questão para o emprego de microrganismos endófitas para fins agrônômicos, depois de se ter o isolado selecionado, implica em como dispensá-los na planta, de forma que penetrem e se estabeleçam nos tecidos. Métodos práticos e confiáveis devem ser desenvolvidos, sendo que os utilizados para aplicação de inoculantes microbianos na rizosfera e filosfera podem ser válidos para endófitas (Andrews, 1992).

## Referências

- Adams, P.D.; Klopper, J.W. Seed-borne bacterial endophytes in different cotton cultivars. *Phytopathology* 86: S97. 1996. (Abstract).
- Andrews, J.H. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603-635. 1992.
- Axelrod, B.; Cheskrough, T.M. & Laakso, S. Lipoxigenase from soybean. *Methods in Enzymology* 71: 441-451. 1981.
- Bacon, C.W. & White Jr., J.F. *Microbial Endophytes*. New York. Marcel Deker. 2000.
- Bacon, C.W.; Richardson, M.D. & White Jr., J.F. Modification and uses of endophytic-enhanced turfgrasses: a role for molecular technology. *Crop Science* 37: 1415-1425. 1997.
- Bashan, Y. & Holguin, G. *Azospirillum* - Plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology* 139: 103-121. 1997.
- Bashan, Y.; Ream, Y.; Levanoy, H. & Sade, A. Non-specific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd. *Canadian Journal of Botany* 67: 1317-1324. 1989.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology* 33: 145-172. 1995.
- Bhattacharya, M.K. & Ward, E.W.B. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean hypocotyls and leaves following infection with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Canadian Journal of Botany* 66: 18-23. 1988.
- Cameron, H.R. Pseudomonas content of cherry trees. *Phytopathology* 60: 1343-1346. 1970.
- Cattellan, A.J. Métodos Quantitativos para Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. Londrina. Embrapa Soja. 1999.
- Chen, C.; Bauske, E.M.; Musson, G.; Rodriguez-Kabana, R. & Klopper, J.W. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control* 5: 83-91. 1995.
- Chen, Y.; Mei, R.; Liu, L. & Klopper, J.W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: Utkhede, R.S. & Gupta, V.K. (Ed.) *Management of soil born diseases*. Ludhiana. Kalyani Publishers. 1996. pp. 165-184.
- Clay, K. Fungal endophytes of grasses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 275-295. 1990.
- De Boer, S.H. & Coperman, R.J. Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot disease. *Canadian Journal of Plant Science* 54: 115-122. 1974.
- Dong, Z.; Canny, M.J.; McCully, M.E.; Roboredo, M.R.; Cabadilla, C.F.; Ortega, E. & Rodés, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. *Plant Physiology* 105: 1139-1147. 1994.
- El-Abyad, M. S.; El-Sayed, M. A.; El-Shanshoury, A. R. & El-Sabbagh, S. M. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp. *Plant and Soil* 149: 185-195. 1993.
- Frommel, M.I.; Nowak, J. & Lazarovits, G.; Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology* 96: 928-936. 1991.



- Glick, B.R. & Bashan, Y. Genetic manipulation of plant growth-promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances* 15: 353-378. 1997.
- Godoy, C.V.; Bergamin Filho, A. & Salgado, C.L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati, H. (Ed.) Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas e seu controle, v.2. 3ª. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1997. pp.184-200.
- Guetskyl, R.; Shtienberg, D.; Dinoor, A. & Elad, Y. Establishment, survival and activity of the biocontrol agents *Pichia guillemontii* and *Bacillus mycoides* applied as a mixture on strawberry plants. *Biocontrol Science and Technology* 12: 705-714. 2002.
- Hallmann, J. Plant interactions with endophytic bacteria. In: Jeger, M.J. & Spencer, N.J. Biotic interactions in plant pathogen associations. CAB. p.87-120. 2001.
- Hallmann, J.; Quadt-Hallmann, A.; Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 895-914. 1997.
- Hammerschmidt, R.; Nuckles, E. & Kuc, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological Plant Pathology* 20: 73-80. 1982.
- Hinton, D.M. & Bacon, C.E. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia* 129: 117-125. 1995.
- Holland, M.A. Occam's razor applied to hormonology. Are cytokinins produced by plants? *Plant Physiology* 115: 865-868. 1997.
- Kloepper, J.W. Plant growth promotion rhizobacteria as biological control agents. In: Meeting Jr., F.B. (Ed.) Soil microbial ecology: Applications in agricultural and environmental management. New York. Academic Press. 1993. pp. 255-274.
- Kloepper, J.W.; Zablutowicz, R.M.; Tipping, E.M. & Lifshitz, R. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In: Metting, B.; Dekker, M. & Cregan, P. B. (Eds.) The rhizosphere and plant growth. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers. 1991. pp. 315-326.
- Kloepper, J.W.; Lifshitz, R. & Schroth, M.N. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Science: Animal Plant Science. 1988. pp. 60-64.
- Kowalski, T. & Sadlowski, W. Endophytic fungi II. Their importance for plants and possibilities of use. *Sylwan* 137: 9-15. 1993.
- Lazarovits, G. & Nowak, J. Rhizobacteria for improvement of plant growth and establishment. *HortScience* 32: 188-192. 1997.
- Leben, C. How plant pathogens survive. *Plant Disease* 65: 633-637. 1981.
- Levy, E. & Carmeli, S. Biological control of plant pathology by antibiotic-producing bacteria. Allelopathy, organisms, process and applications. Washington, DC. American Chemical Society. 1995. pp. 300-309.
- McInroy, J.A. & Kloepper, J.W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil* 173: 337-342. 1995a.
- McInroy, J.A. & Kloepper, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 895-901. 1995b.
- Mundt, J.O. & Hinkle, N.F. Bacteria within ovules and seeds. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 694-698. 1976.
- Musson, G. Ecology and effects of endophytic bacteria in plants. Master Dissertation. Auburn. Auburn University. 1994.
- Pan, M.J.; Rademan, S.; Kunert, K. & Hastings, J.W. Ultrastructural studies on the colonization of banana tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 by the endophytic bacterium *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* 45: 479-486. 1997.
- Pascholati, S.F.; Nicholson, R.L. & Butler, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *Journal of Phytopathology* 115: 165-172. 1986.
- Podile, A.R. & Laxmi, V.D.V. Seed factorization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia-lyase and reduces the incidence of Filarial wilt in pigeon pea. *Journal of Phytopathology* 146: 255-259. 1998.
- Schardl, C.L. & Phillips, T.D. Protective grass endophytes. Where are they from and where are they going? *Plant Disease* 81: 430-438. 1997.
- Shiomi, H.F.; Silva, H.S.A.; Melo, I.S.; Nunes, F.V. & Bettiol, W. Bioprospecting bacteria for biological control of coffee leaf rust. *Scientia Agricola* 63: 32-39. 2006.
- Shishido, M.; Breuil, C. & Chanway, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 191-196. 1999.

- Silva, H.S.A.; Terrasan, C.R.F.; Tozzi, J.P.L.; Melo, I.S. & Bettiol, W. Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). *Tropical Plant Pathology* 33: 49-54. 2008.
- Stirling, G.R. Mass production and release of biological control agents. In: Stirling, G.R. *Biological control of plant parasitic nematodes – Progress, problems and prospects*. Redwood Press. Mekshom. 1991. pp. 125-165.
- Strobel, G.A. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology* 22: 315-333. 2002.
- Strobel, G.A. & Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 491-502. 2003.
- Sturz, A.V. & Nowak, J. Endophytic communities of rhizobacteria and strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology* 15: 183-190. 2000.
- Sumner, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Advances in Soil Science* 12: 53-123. 1990.
- van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-483. 1998.
- Verma, S.C.; Ladha, J.K. & Tripathi, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology* 91: 127-141. 2001.
- Weller, D.M.; Zhang, B.X. & Cook, R.J. Application of a rapid screening test for selection of bacteria suppressive to take-all of wheat. *Plant Disease* 69: 710-713. 1985.
- Whipps, J.M. Developments in the biological control of soil-borne plant pathogens. *Advances in Botanical Research* 26: 1-134. 1997.
- White Jr., J.F.; Martin, T.I. & Cabral, D. Endophyte-host associations in grasses. XXII. Conidia formation by *Acremonium* endophytes on the phyllplanes of *Agrostis hiemalis* and *Poa rigidifolia*. *Mycologia* 88: 174-178. 1996.
- Whitesides, S.K. & Spotts, R.A. Frequency, distribution and characteristics of endophytic *Pseudomonas syringae* in pear trees. *Phytopathology* 81: 453-457. 1991.
- Wilhelm, E.; Arthofer, W.; Schafleitner, R. & Krebs, B. *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 52: 105-108. 1998.
- Wilson, D. Endophyte – the evolution of a term, and classification of its use and definition. *Oikos* 73: 274-276. 1995.

## Capítulo 19

# Controle Biológico de Doenças de Flores e Frutos Jovens de Citros

Katia Cristina Kupper

*Centro APTA Citros "Sylvio Moreira" - Instituto Agrônômico, Av. Anhanguera, Km 158,  
13490-970, Cordeirópolis, SP, Brasil, e-mail: katia@centrodecitricultura.br*

## Introdução

O Brasil é o maior produtor de citros, além de grande exportador de suco de laranja (Citrusfeat, 2001). Cerca de 80% da produção é destinada à industrialização, sendo o suco exportado para vários países da Europa, além dos Estados Unidos da América e Japão. O faturamento com as exportações de suco em 2004 foi de, aproximadamente, US\$1 bilhão. O Brasil ocupou em 2004/2005 o 11º lugar em exportação de frutas frescas, com 82 mil toneladas (FNP Consultoria & Agroinformativos, 2006).

O setor citrícola enfrenta sérios problemas representados por doenças de flores e frutos jovens que, além de diminuir a produtividade, depreciam os frutos. Dentre tais doenças, destacam-se a mancha preta e a queda prematura dos frutos.

A mancha preta dos citros (*Guignardia citricarpa*) foi descrita pela primeira vez em 1895 na Austrália, afetando frutos de laranja 'Valência', tanto em pomares, como em pós-colheita (Kiely, 1948b). Sua presença é relatada na Oceania (Austrália), África (África do Sul, Moçambique, Swazilândia e Zimbábwe), Ásia (China, Indonésia, Taiwan e Japão) e América do Sul (Brasil, Argentina e Peru) (Kiely, 1948 ab; Kotzé, 1963/1988).

No Brasil, a mancha preta dos citros foi inicialmente observada em frutos das variedades Pêra e Seleta, em feira livre de Piracicaba, São Paulo, entre 1938 e 1940 (Averna-Saccá, 1940). Nos anos seguintes não foram observados sintomas e, somente na década de 80 foi registrado o seu restabelecimento na citricultura no estado do Rio de Janeiro (Robbs *et al.*, 1980). No estado de São Paulo, em 1992, foi novamente verificada, desta vez causando elevados prejuízos em limão 'Siciliano', na região de Mogi Guaçu (Goes & Feichtenberger, 1993).

A doença também ocorre no Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Espírito Santo, Santa Catarina e Amazonas. O seu controle baseia-se na utilização de fungicidas protetores ou sistêmicos, isoladamente ou combinados, associados ou não a óleo mineral (Goes *et al.*, 1990, Prates & Nogueira, 1997). Bons resultados de controle são obtidos com intervalos de pulverizações de 50 a 55 dias, no caso de fungicida sistêmico + protetores (Goes, 1998) e de 28 dias para os fungicidas protetores (Schutte *et al.*, 1997).

A queda prematura dos frutos cítricos (*Colletotrichum acutatum*) ocorre nos trópicos e subtropicais úmidos das Américas. No Brasil, a doença foi relatada inicialmente no Rio Grande do Sul (Dornelles, 1977) e, atualmente, está presente nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Bahia, Minas Gerais, Goiás e Amazonas. Condições que propiciam mais de uma florada ou variedades que florescem mais de uma vez por ano, favorecem a ocorrência da doença. No Brasil, a doença é mais severa nos limões verdadeiros, em lima ácida 'Tahiti', no limão 'Galego' e na laranja 'Pêra' (Feichtenberger, 1991). A medida predominante de controle da queda prematura dos frutos cítricos é a pulverização com fungicidas na época da florada. Uma das dificuldades de se controlar a doença é que ela é mais severa quando períodos longos de chuva ou umidade elevada ocorrem por ocasião do pico de florescimento (Denham & Waller, 1981). Nessas condições é mais difícil efetuar as aplicações dos fungicidas e os produtos são facilmente lavados. Outra dificuldade é a ocorrência de várias floradas, que exige maior número de pulverizações e aumenta o desequilíbrio biológico do pomar. Talvez o fator mais crítico no controle da queda prematura dos frutos, a baixo custo, seja decidir quando aplicar o produto, uma vez que pulverizações preventivas, embora possam ser efetivas, são onerosas, podendo inclusive não aumentar a produção, caso seja baixa a incidência da doença (Timmer *et al.*, 1994).

O controle biológico surge como alternativa, pois, em muitos casos, constitui-se em tecnologia poupadora de capital. Dentre os antagonistas mais estudados, *Bacillus subtilis* destaca-se no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita (Pusey *et al.*, 1986; Ferreira *et al.*, 1991; Bettiol *et al.*, 1994). Kalita *et al.* (1996) isolaram bactérias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* e *Pseudomonas fluorescens*) e fungos (*Aspergillus terreus*, *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum*) da parte aérea de plantas cítricas, os quais mostraram antagonismo *in vitro* à *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Dentre esses antagonistas, *Bacillus subtilis* foi o que produziu a maior zona de inibição (14,7 mm). Sob condições de casa-de-vegetação, *Bacillus subtilis* reduziu a incidência da doença em torno de 61,9%, quando aplicado simultaneamente à inoculação de *Xanthomonas axonopodis*. Sonoda & Guo (1996) verificaram a eficiência do produto Kodiak® (*Bacillus subtilis*) no controle da queda prematura de frutos cítricos em três pomares de laranja 'Natal' na Flórida. Poucas flores foram infectadas e poucos cálices ficaram retidos em árvores protegidas com a bactéria, quando comparado com a testemunha, além do que o pegamento dos frutos foi maior em plantas tratadas com o produto.

## **Antagonistas para o Controle da Queda Prematura dos Frutos Cítricos no Brasil**

Para avaliar o potencial de *Bacillus subtilis* e de *Trichoderma* spp no controle de *Colletotrichum acutatum*, foram realizados estudos em laboratório e campo. Inicialmente foi realizada a seleção e a identificação dos antagonistas e analisadas

as interações *in vitro* entre os antagonistas e o patógeno. A seguir, foram realizados testes com flores destacadas de citros, visando verificar o efeito dos agentes de biocontrole sobre a infecção causada por *Colletotrichum acutatum* e, finalmente foi avaliada a eficiência no controle da doença sob condições de campo.

Os agentes de biocontrole foram obtidos a partir de amostras de solo, folhas e flores retiradas de pomares de citros onde a doença ocorre naturalmente, porém não de forma intensa, nos municípios paulistas de Altinópolis, Bebedouro, Botucatu, Itápolis, Jaboticabal, Mogi-Guaçu, Taiacu, Taiúva e Taquaral. Os isolados de *Trichoderma* foram obtidos de solo da projeção da copa da árvore (Centurion & Kimati, 1994). Para a obtenção dos isolados de *Bacillus* de folhas e flores de citros, adaptou-se a técnica descrita por Bettiol (1995). Efetuou-se uma pré-seleção das colônias obtidas mediante pareamento com *Colletotrichum acutatum* e as que inibiram o crescimento do patógeno foram identificadas e preservadas. Sessenta e quatro isolados de *Bacillus subtilis*, quatro de *Bacillus* spp., cinco de *Trichoderma aureoviride*, três de *Trichoderma harzianum* e *Trichoderma koningii*, um de *Trichoderma viride*, *Trichoderma pseudokoningii* e *Trichoderma virens* e um isolado de *Trichoderma* sp. foram obtidos. Todos foram avaliados quanto à produção de metabólitos com atividade contra *Colletotrichum acutatum* e capacidade de prevenir a infecção pelo patógeno em flores de lima ácida 'Tahiti', em condições de laboratório.

Os isolados de *Trichoderma* inibiram o crescimento micelial de *Colletotrichum*, quando pareados em meio de cultura. Observações ao microscópio eletrônico de varredura mostraram alterações morfológicas no patógeno, tais como engrossamento e encurtamento das células e destruição das hifas. As hifas de *Trichoderma* apresentaram-se enroladas, em forma de espiral, nas hifas do patógeno ou associadas em paralelo, restringindo o seu desenvolvimento. Com exceção dos isolados 04 e 30 de *Trichoderma harzianum*, os demais produziram metabólitos *in vitro* que inibiram o crescimento micelial do patógeno. Os isolados de *Trichoderma harzianum* (ACB-30 e 04), *Trichoderma viride* (ACB-14), *Trichoderma aureoviride* (ACBs 03, 33 e 39), *Trichoderma virens* (ACB-32), *Trichoderma pseudokoningii* (ACB-37) e *Trichoderma* sp. (ACB-40) foram os mais eficientes na prevenção da infecção por *Colletotrichum acutatum* em flores de lima ácida 'Tahiti', quando aplicados 24 h antes da inoculação do patógeno. Quando aplicados simultaneamente à inoculação do patógeno, nenhum dos isolados de *Trichoderma* inibiu a infecção.

Os isolados de *Bacillus subtilis* produziram metabólitos que inibiram o crescimento micelial do patógeno, mesmo após autoclavagem a 120 °C/20 min. Sessenta e um dos 64 isolados de *Bacillus subtilis* preveniram a infecção de flores destacadas de lima ácida 'Tahiti' por *Colletotrichum*, quando aplicados simultaneamente à inoculação do patógeno. Por outro lado, 53 preveniram a infecção quando aplicados 24 h antes da inoculação.

Em pomar de laranja 'Natal', enxertada sobre limoeiro 'Volkameriano', com 14 anos, localizado no município de Mogi Guaçu, SP, foram testados, em três pulverizações, sete isolados de *Bacillus subtilis* (ACB-11, 15, 16, 69, 70, 72 e 77), um de *Trichoderma viride* (ACB-14), um de *Trichoderma pseudokoningii* (ACB-37) e um de *Trichoderma aureoviride* (ACB-39) para o controle da queda prematura de frutos cítricos. O fungicida padrão utilizado foi o benomil.

Os antagonistas foram aplicados com pulverizador manual até o ponto de escorrimento. Apenas um lado da planta foi pulverizado, gastando-se 1 litro por planta de suspensão com  $1,2 \times 10^7$  células/ml. As aplicações foram realizadas nos estádios de florescimento denominados de "cabeça de fósforo" e de "cotonete". A primeira avaliação da incidência da doença foi realizada 17 dias após a primeira pulverização, contando-se o número de flores com sintomas de infecção por *Colletotrichum acutatum* e o número de flores sadias, em uma amostra de 100 flores. A segunda avaliação foi aos 73 dias após a primeira, contando-se o número de frutos vingados e o número de cálices retidos e/ou amarelecidos devido à doença, a fim de se obter o número médio de frutos efetivos, calculados pela fórmula:  $NFE = (A / (A + B)) \times 100$ , onde A = no de frutos vingados e B = no de cálices retidos e/ou no de frutos amarelecidos devido à doença (Goes, 1995).

**Tabela 1.** Efeito dos agentes de controle biológico na porcentagem de flores com sintomas de infecção por *Colletotrichum acutatum* e no número de frutos efetivos, em plantas de laranja 'Natal', em condições de campo.

Tratamento	% de flores com sintomas	Número de Frutos Efetivos
ACB-14 - <i>Trichoderma viride</i>	58,97 a <sup>(1)</sup>	17,77 cd <sup>(1)</sup>
ACB-70 - <i>Bacillus subtilis</i>	57,42 ab	14,77 d
ACB-37 - <i>Trichoderma pseudokoningii</i>	50,24 abc	28,04 cd
ACB-72 - <i>Bacillus subtilis</i>	50,18 abc	29,72 bcd
ACB-16 - <i>Bacillus subtilis</i>	49,12 abc	26,21 cd
ACB-11 - <i>Bacillus subtilis</i>	48,45 abc	23,59 cd
ACB-77 - <i>Bacillus subtilis</i>	44,31 bc	29,42 bcd
ACB-39 - <i>Trichoderma aureoviride</i>	43,27 c	24,95 cd
ACB-15 - <i>Bacillus subtilis</i>	42,26 c	33,15 bc
ACB-69 - <i>Bacillus subtilis</i>	26,15 d	44,35 ab
Testemunha	55,05 abc	23,17 cd
Benomil	18,72 d	49,46 a

<sup>(1)</sup>Para análise os dados foram transformados em  $\arcsin(x + 0,5)^{1/2}$ . Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Duncan, P <sup>3</sup> 0,05).

## Antagonistas no Controle da Mancha Preta dos Frutos Cítricos no Brasil

O potencial de quatro isolados de *Bacillus subtilis* e 15 de *Trichoderma* foram avaliados para o controle de *Guignardia citricarpa* (anamorfo: *Phyllosticta citricarpa*), agente causal da mancha preta dos frutos cítricos, sob condições de laboratório e de campo. Os isolados foram os utilizados no estudo anterior. A inibição do crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* foi avaliada pela técnica do cultivo pareado em placas de Petri.

Os estudos para o controle da mancha preta dos citros, sob condições de campo, foram realizados em duas safras. Na safra 2001/2002, o experimento foi conduzido em pomar de laranjeira 'Natal' enxertada sobre

limoeiro 'Cravo', com 12 anos de idade, com espaçamento de 7 x 3,5 m, localizado no município de Rincão, SP. A multiplicação dos isolados de *Bacillus subtilis* (ACBs 69, 72, 77 e AP-3) foi em meio à base do resíduo da fermentação glutâmica do melaço (Aminofertil®) a 5%, durante 72 h (Bettiol & Astiarraga, 1998). Na safra 2002/2003 os estudos foram conduzidos em pomar de laranjeira 'Natal' enxertada sobre limoeiro 'Cravo', com oito anos de idade, localizado no município de Santa Rita do Passa Quatro, SP, em área de notório histórico da doença. Além dos isolados de *Bacillus subtilis* (AP-3, ACB 69, 72 e 77) testaram-se os isolados de *Trichoderma*, *Trichoderma viride* (ACB-14) e *Trichoderma* sp. (ACB-40) que inibiram o patógeno *in vitro*. A multiplicação de *Bacillus subtilis* foi em meio à base de farelo de algodão (Bettiol *et al.*, 2005). A multiplicação de *Trichoderma* foi em meio à base de batata-dextrose. Os caldos fermentados por *Bacillus subtilis* ou *Trichoderma* foram diluídos a 10% e comparados com o tratamento padrão [cobre metálico (100 g de oxicleto de cobre/100 l de água) e carbendazim + mancozeb (25 g de i.a. + 160 g de i.a./100 l de água, respectivamente, acrescidos de óleo mineral a 0,5% (Fundecitrus, 1998)]. Na safra 2001/2002 avaliou-se, também, a mistura dos isolados de *Bacillus subtilis* (ACBs 69+72+77+AP-3) e um biofertilizante na concentração de 10% (Kupper *et al.*, 2006). A primeira pulverização foi realizada em 15/10/2001 (após a queda de 3/4 das pétalas). As pulverizações com *Bacillus subtilis* foram repetidas 28, 56, 84, 112 e 140 dias após a primeira. Para o tratamento padrão foram realizadas duas aplicações com oxicleto de cobre, na data da primeira pulverização e 28 dias após e duas com a mistura carbendazim + mancozeb aos 84 e 140 dias após a primeira pulverização. A mistura de isolados de *Bacillus* foi preparada utilizando-se proporções iguais dos isolados. Na safra 2002/2003, no primeiro ensaio, os antagonistas e os fungicidas foram aplicados de acordo com o esquema descrito para a safra 2001/2002, cuja primeira aplicação foi realizada em 08/10/2002. No outro ensaio, as pulverizações com os agentes de biocontrole foram quinzenais, enquanto os fungicidas foram aplicados de forma semelhante à safra 2001/2002, sendo a primeira pulverização em 23/10/2002.

Fungicidas e antagonistas foram aplicados com pulverizador tratorizado, dotado de duas pistolas. O volume de calda aplicado foi calibrado para atingir o ponto de escorrimento, sendo utilizados 100 l de calda/tratamento. As concentrações de células nos caldos fermentados com *Bacillus* foi de  $10^8$  UFC/ml na safra 2001/2002 e de  $10^9$  UFC/ml e  $10^7$  esporos/ml para *Bacillus subtilis* e *Trichoderma*, respectivamente, na safra 2002/2003. As avaliações foram realizadas por ocasião da colheita, em 50 frutos coletados ao acaso da planta central de cada parcela, com o auxílio de uma escala de notas de severidade da mancha preta dos frutos cítricos, sendo: 0 = ausência de sintomas; 1 = 0,9% até 6 = 17,3% de área coberta com sintomas (Fagan, 1999). Posteriormente, determinou-se o índice de doença [ID =  $\Sigma ((fv) \times 100)/n$ ], onde f = número de frutos com determinado grau de infecção; v = grau de infecção e n = número total de frutos amostrados]. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro e cinco repetições nos ensaios da safra 2001/2002 e 2002/2003, respectivamente. Cada parcela experimental foi constituída por três plantas.

Os isolados de *Bacillus subtilis* inibiram o crescimento micelial de *Phyllosticta citricarpa* em torno de 15 a 23%, enquanto que os de *Trichoderma* (isolados 14 e 40) inibiram em 50 e 57%, respectivamente. Esses resultados fogem do esperado, considerando que, de modo geral, os isolados de *Bacillus subtilis* estudados agem por antibiose (Kupper & Gimenes-Fernandes, 2002).

No ensaio instalado na safra 2001/2002, em Rincão, SP, a severidade da mancha preta nos frutos cítricos foi alta. O controle da doença com fungicidas foi o mais eficiente (Tabela 2). O biofertilizante foi efetivo em controlar a doença, diferindo estatisticamente da testemunha, porém não como o controle químico. O potencial do uso de biofertilizante para controle da doença foi relatado por Kupper *et al.* (2006), onde os autores verificaram a possibilidade de usá-lo como biofungicida protetor, em substituição ao oxiclóreto de cobre. Dentre os isolados de *Bacillus*, apenas o ACB-69 diferiu da testemunha, porém, não diferiu dos demais isolados e da mistura dos isolados.

De forma semelhante ao ano anterior, a severidade da doença foi alta na safra 2002/2003 e o melhor controle obtido com fungicidas (Tabela 2). Os isolados de *Bacillus subtilis* ACB-69 e ACB-AP3 foram os que proporcionaram os menores índices de doença, respectivamente, quando comparados com os outros agentes de biocontrole, diferindo estatisticamente da testemunha, quando as pulverizações ocorreram a cada 28 dias.

**Tabela 2.** Efeito de *Trichoderma* spp., *Bacillus subtilis* e biofertilizante no índice da mancha preta dos frutos cítricos (*Guignardia citricarpa*) em plantas de laranja 'Natal', pulverizadas com, sob condições de campo, nas safras 2001/2002 e 2002/2003.

Tratamento	2001/2002	2002/2003	
		A cada 28 dias	A cada 15 dias
Testemunha	3,43 a <sup>(1)</sup>	2,12 ab	1,90 a
AP3 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	3,14 ab	1,72 c	1,92 a
ACB-77 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	3,09 ab	2,19 a	1,83 a
ACB-72 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	2,94 ab	1,78 bc	1,80 a
ACB-69 ( <i>Bacillus subtilis</i> )	2,42 b	1,70 c	1,68 a
ACB-14 ( <i>Trichoderma viride</i> )	-	1,94 abc	1,82 a
ACB-40 ( <i>Trichoderma</i> sp.)	-	1,91 abc	1,65 a
Mistura (AP3 e ACBs 77, 72, 69)	3,05 ab	-	-
Biofertilizante	2,48 b	-	-
Controle químico	1,19 c	1,08 d	0,29 b

<sup>(1)</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si (Duncan a 5%).

Baseando-se em resultados anteriores, presumia-se que com intervalos menores entre as aplicações dos agentes de biocontrole, a eficiência seria maior. Entretanto, a redução do intervalo de aplicação de 28 para 15 dias não proporcionou aumento em termos de controle da doença. Segundo Korsten & Jeffries (2000), os agentes de controle biológico necessitam se estabelecer, até um determinado nível crítico no interior da copa da árvore, antes que o efetivo controle possa ocorrer. Além disto, tal fato sugere que maiores concentrações de células do antagonista possam gerar competição por espaço ou nutriente entre eles ou, até mesmo a produção de metabólitos tóxicos poderia prejudicar as próprias células e, conseqüentemente, de uma maneira ou outra, desfavorecer o biocontrole.



Um aspecto importante a ser reportado refere-se ao uso de acaricidas e inseticidas nas áreas experimentais, o que possivelmente pode ter refletido em menor eficiência dos antagonistas, dado a um possível efeito deletério sobre eles. Esse fato deve ser considerado em estudos adicionais para dirimir eventuais dúvidas. Entretanto, como a integração das formas de controle é indispensável para o manejo integrado de pragas, há necessidade de se conhecer a sensibilidade dos agentes de biocontrole aos produtos aplicados. Nesse sentido, Korsten *et al.* (1997) verificaram que aplicações pré-colheita com *Bacillus subtilis*, sozinho ou integrado com fungicidas, em especial oxicloreto de cobre, reduziram efetivamente, em condições de campo, infecções naturais de *Pseudocercospora purpura* em abacate. Esses autores discutiram a importância da combinação de produtos biológicos com os químicos na proteção da cultura, o que pode aumentar a aceitação dos agricultores.

O meio de cultura para a produção de agentes de biocontrole é fundamental para o sucesso da técnica, pois além da produção de células, para antagonistas que agem por antibiose é indispensável a produção de antibióticos. Segundo Bettiol *et al.* (2005), farelo de algodão, acrescido de proteína hidrolisada, mostrou ser adequado para a multiplicação de células e produção de metabólitos por *Bacillus subtilis* e, em especial pelo ACB-69, o qual apresentou o melhor resultado no controle da doença, quando comparado com os demais antagonistas, na safra 2002/2003. Porém, Stockweel *et al.* (1998), em um estudo sobre o estabelecimento de bactérias antagonistas a *Erwinia amylovora* sobre flores de pêra e maçã, verificaram que a forma de preparação da suspensão de bactérias antagonistas (*Erwinia herbivora*) pode influenciar na sua sobrevivência na parte aérea das plantas. Segundo os autores, com o uso de células liofilizadas, em experimentos de campo, a sobrevivência da bactéria é melhor e são obtidos dados mais consistentes, em comparação com a aplicação de células contidas em meio de cultura. Este tipo de estudo se faz necessário para conhecer os fatores que possam impedir o sucesso do controle biológico no manejo de doenças de plantas.

Em função da importância das doenças em citros, dos preços praticados no mercado nacional e internacional e das exigências do mercado por frutas isentas de resíduos químicos, medidas de controle que causem menor impacto ambiental e social são desejadas. Por essa razão, apesar dos antagonistas não terem proporcionado o mesmo nível de controle do tratamento padrão com fungicidas, pode-se admitir que poderão ser uma alternativa para o manejo da mancha preta dos citros.

O controle da doença pode não estar adequado para o mercado convencional de frutas frescas, como discutido por Reis *et al.* (2003), porém poderá ser adequado para o mercado brasileiro de produtos orgânicos. Para tanto, há necessidade de se continuarem os testes para determinar as épocas adequadas de aplicação, bem como a concentração e a formulação dos antagonistas, além da influência das condições climáticas por ocasião das pulverizações. Esses estudos devem ser realizados em condições de cultivo, pois nem sempre há correlação entre os dados obtidos *in vitro* e *in vivo*.

## Considerações Finais

Os isolados de *Bacillus subtilis* foram mais eficientes do que os de *Trichoderma* no controle da queda prematura de frutos cítricos e da mancha preta dos citros. Considerando que não seja possível o controle dessas doenças com fungicidas, a utilização de antagonistas pode ser uma alternativa para minimizar os custos de produção de citros, além de contribuir para uma agricultura mais sustentável e com menores impactos negativos ao ambiente.

## Referências

- Averna-Saccá, R. Pústulas pretas sobre laranjas doces produzidas pelo *Phoma citricarpa*. Revista de Agricultura 15: 668-674. 1940.
- Bettiol, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: Melo, I.S. de & Sanhueza, R.M.V. (Coords.) Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos: manual técnico. Jaguariúna. EMBRAPA-CNPMA. 1995. pp. 35-36.
- Bettiol, W. & Astiarraga, B.D. Controle de *Sphaerotheca fuliginea* em abobrinha com resíduo da fermentação glutâmica do melão e produto lácteo fermentado. Fitopatologia Brasileira 23: 431-435. 1998.
- Bettiol, W.; Saito, M.L. & Brandão, M.S.B. Controle da ferrugem do cafeeiro com produtos a base de *Bacillus subtilis*. Summa Phytopathologica 20: 119-122. 1994.
- Bettiol, W.; Kupper, K.C.; Goes, A.; Moretto, C. & Correa, E.B. Mass production of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma viride* for the control of *Phyllosticta citricarpa* (teleomorph: *Guignardia citricarpa*). Summa Phytopathologica 31: 276-278. 2005.
- Centurion, M.A.P.C. & Kimati, H. Seleção e identificação de microrganismos antagonísticos a ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*). Summa Phytopathologica 20: 174-178. 1994.
- Citrusfeat. Fresh citrus situation. FASonline. Horticultural & Tropical Products Division. 2001. Disponível em: <<http://www.faz.usda.gov>>. Acesso em: 16 set. 2002.
- Denham, T.G. & Waller, J.W. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. Annals of Applied Biology 98: 65-67. 1981.
- Dornelles, C.M.M. O problema da queda de frutos jovens de citros no Rio Grande do Sul. In: Mesa Redonda para Estudo da Queda de Frutos Jovens em Citrus. Taquari, RS. 1977. pp. 3-6.
- Fagan, C. Efeito da mancha preta dos frutos cítricos, causada por *Guignardia citricarpa*, nas características tecnológicas do suco de frutos de laranja 'Natal' e 'Valência'. Trabalho de Graduação. Jaboticabal, SP. FCAV/UNESP. 1999.
- Feichtenberger, E. Queda de frutos jovens em citros. Laranja 12: 513-521. 1991.
- Ferreira, J.H.S.; Mathee, F.N. & Thomas, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. Phytopathology 81: 283-287. 1991.
- FNP Consultoria & Agroinformativo. Laranja. In: Agriannual 2006: anuário da agricultura brasileira. 2005. pp. 257-300.
- Fundecitrus. Manual Técnico Sobre Pinta Preta. Araraquara. 1998. 10 p. (Boletim).
- Goes, A. de. Queda prematura de frutos cítricos: Caracterização do agente causal, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. (Sensu Arx, 1957), e controle da doença. Tese de Doutorado. Piracicaba, SP. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 1995.
- Goes, A. de. Controle da mancha preta dos frutos cítricos. Laranja 19: 305-320. 1998.
- Goes, A. de & Feichtenberger, E. Ocorrência da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de São Paulo. Fitopatologia Brasileira 18: 138. 1993. (Resumo).
- Goes, A. de; Graça, J.; Barros, J.M. de & Pinheiro, J.E. Controle de pinta preta em frutos de tangerina "Rio" (*Citrus deliciosa*) ocasionada por *Phyllosticta citricarpa*. Fitopatologia Brasileira 15: 73-75. 1990.

- Kalita, P.; Bora, L.C. & Bhagabati, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology* 49: 234-237. 1996.
- Kiely, T.B. Control and Epiphytology of Black Spot of Citrus on the Central Coast of New South Wales. New South Wales. Department of Agriculture Science Bulletin. 1948a.
- Kiely, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n.sp.: the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 73: 249-292. 1948b.
- Korsten, L. & Jeffries, P. Potencial for biological control of diseases caused by *Colletotrichum*. In: Prusky, D.; Freeman, S. & Dickman, M.B. (Eds.) *Colletotrichum* host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. St. Paul. APS Press. 2000. pp. 266-291.
- Korsten, L.; De Villiers, E. E.; Wehner, F.C. & Kotzé, J.M. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South Africa. *Plant Disease* 81: 455-459. 1997.
- Kotzé, J.M. Studies on the black spot diseases of citrus caused by *Guignardia citricarpa* Kiely, with particular reference to its epiphytology and control at Labata. Ph.D. Thesis. Pretoria. Science of Agriculture University of Pretoria. 1963.
- Kotzé, J.M. Black spot. In: Whiteside, J.O.; Garnsey, S.M. & Timmer, L.W. (Ed.) *Compendium of citrus diseases*. 2<sup>nd</sup>. Ed. St. Paul. APS Press. 1988. pp. 10-12.
- Kupper, K.C. & Gimenes-Fernandes, N. Isolamento e seleção de *Bacillus* spp. para o controle de *Colletotrichum acutatum* em flores destacadas de lima ácida 'Tahiti'. *Summa Phytopathologica* 28: 292-295. 2002.
- Kupper, K.C.; Bettiol, W.; Goes, A. de; Souza, P.S. de & Bellotte, J.A.M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *Crop Protection* 25: 569-573. 2006.
- Prates, H.S. & Nogueira, N.L. Controle químico da pinta preta (*Phyllosticta citricarpa*) em laranjeiras Pêra. *Summa Phytopathologica* 23: 53. 1997. (Resumo).
- Pusey, P.L.; Wilson, C.L.; Hotchkiss, M.W. & Franklin, J.D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with comercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. *Plant Disease* 70: 587-590. 1986.
- Reis, R.F.; Goes, A. de & Pereira, G.T. Efeito da aplicação de oxicleto de cobre em diferentes épocas no controle da mancha preta dos citros causada por *Guignardia citricarpa*. *Summa Phytopathologica* 29: 12-18. 2003.
- Robbs, C.F.; Pimentel, J.P. & Ribeiro, R.L. A mancha preta dos citros causada por *Phoma citricarpa*. *Fitopatologia Brasileira* 5: 455. 1980 (Resumo).
- Schutte, G.C.; Beeton, K.V. & Kotzé, J.M. Rind stippling on Valencia oranges by copper fungicides used for control of citrus black spot in South Africa. *Plant Disease* 81: 851-854. 1997.
- Sonoda, R.M. & Guo, Z. Effect of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. *Phytopathology* 86: S52. 1996. (Abstract).
- Stockwell, V.O.; Johnson, K.B. & Loper, J.E. Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. *Phytopathology* 88: 506-513. 1998.
- Timmer, L.W.; Agostini, J.P.; Zitko, S.E. & Zulfiqar, M. Postbloom fruit drop, and increasingly prevalent disease of citrus in the Americas. *Plant Disease* 78: 329-334. 1994.

## Capítulo 20

# Análise da Viabilidade Comercial de Produtos à Base de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* para o Controle de Fitopatógenos no Brasil

Fabiana D'Agostino<sup>1</sup> & Marcelo Augusto Boechat Morandi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>BioControle Ltda. Rua João Anes, 117, 05060-020, Lapa, São Paulo, SP, Brasil, e-mail: [fabiana@biocontrole.com.br](mailto:fabiana@biocontrole.com.br); <sup>2</sup>Embrapa Meio Ambiente, CP 69; 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail: [mmorandi@cnpma.embrapa.br](mailto:mmorandi@cnpma.embrapa.br)

## Introdução

Aumentar a produtividade das plantas por meio da melhoria do seu estado fitossanitário com sustentabilidade é um desafio para a humanidade na sociedade moderna. Este objetivo foi conseguido, em muitos casos, com a utilização de variedades resistentes e controle químico. Contudo, para algumas doenças, não há fontes de resistência, além da possibilidade de quebra da resistência por novas raças do patógeno, o que exige melhoramento contínuo. Ainda, o uso indiscriminado de agrotóxicos conduz à degradação do ecossistema, podendo selecionar estirpes do patógeno resistentes aos agrotóxicos e causar problemas de saúde humana e animal (Huang, 1997).

Os dados de comercialização de agrotóxicos fornecidos pelo Sindag (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) mostram a evolução das vendas de fungicidas, com crescimento constante e chegando a R\$993,8 milhões em 2007, valor correspondente a 21,1% do total comercializado. Isso mostra a importância do controle de fitopatógenos na agricultura no Brasil e a necessidade de desenvolvimento e introdução de alternativas de manejo. Nesta situação, o controle biológico torna-se importante e tecnicamente justificável. O controle biológico está em crescimento no Brasil, mas em uma progressão lenta, tanto pela falta de produtos biológicos disponíveis no mercado, como pelo perfil conservador do agricultor brasileiro.

A maior parte da comercialização de produtos microbianos é voltada para a agricultura convencional. Embora alguns produtos sejam usados em grandes culturas anuais com resultados satisfatórios, os cultivos perenes e semiperenes e os cultivos protegidos oferecem melhores condições para o estabelecimento e uso dos microrganismos (Lopes, 2007). Além disso, precisa ser considerado o mercado da agricultura orgânica, que está em crescimento no país.

Há no mercado brasileiro dezenas de produtos à base de fungos e bactérias para o biocontrole (Pomella, 2007). Porém, o Agrofit, banco de dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) mostra que estão registrados somente cinco ingredientes ativos microbiológicos em 18 produtos comerciais. Desses, 17 são inseticidas e um fungicida (Agrofit, 2008. Disponível em [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons), consultado em 26/01/2008). Comparativamente, nos Estados Unidos, 195 ingredientes ativos estavam registrados em 780 produtos comerciais até o final de 2001 (EPA, 2008). Portanto, considerando as perdas causadas pelos fitopatógenos na agricultura, a importância do desenvolvimento de alternativas menos agressivas ao homem e ao ambiente, o avanço nas pesquisas, a constatação do potencial do controle biológico e da disponibilidade de produtos eficazes no mercado internacional e, praticamente, sua ausência no mercado nacional, faz-se necessário o desenvolvimento de produtos, ou a introdução daqueles disponíveis em outros países para o manejo de doenças de plantas no Brasil.

Este capítulo analisa a viabilidade comercial de produtos à base de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* na agricultura brasileira.

## Potencial de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis*

Dentre os antagonistas mais estudados encontra-se a bactéria *Bacillus subtilis*, a qual se destaca no controle de doenças do filoplano e em pós-colheita (Pusey *et al.*, 1986, Ferreira *et al.*, 1991, Kalita *et al.*, 1996, Sonoda & Guo, 1996). *Bacillus subtilis* é efetivo na prevenção e controle de doenças causadas por várias espécies de patógenos. Atua inibindo a germinação de esporos o crescimento do tubo germinativo e micelial dos patógenos, bloqueando o ataque do patógeno à superfície foliar pela formação de uma zona de inibição e também por indução de resistência no hospedeiro. Há produtos no mercado internacional com registro de utilização em plantios de uva, maçã, pêra, amendoim, cucurbitáceas, hortaliças folhosas, crucíferas, pimentão, tomate, cebola, cenoura, herbáceas, ornamentais entre outras (Weller, 1988, Copping, 2004). Produtos formulados a partir de *Bacillus subtilis* são utilizados desde 1983 nos EUA para o tratamento de sementes de amendoim, aplicações foliares e no solo (Weller, 1988).

Outra espécie promissora no controle de doenças de plantas é *Bacillus pumilus*. O modo de ação de *Bacillus pumilus* tem como base a inibição do desenvolvimento do patógeno na superfície foliar, além de ativar o sistema de defesa da planta. Esse antagonista age curativa e preventivamente, contra o desenvolvimento de oídios, míldios, ferrugens e outros patógenos em cereais,

frutíferas, hortaliças e uva (Coping, 2004, Bargabus *et al.*, 2004). De acordo com o compêndio “The Manual of Biocontrol Agents”, há três estirpes de *Bacillus subtilis* registrados e presentes em 34 produtos comerciais uma estirpe de *Bacillus pumilus* registrada e utilizada em um produto comercial. Para discussão da viabilidade comercial desses agentes de biocontrole serão relatados alguns estudos de eficiência destes microrganismos contra importantes patógenos em culturas agrícolas no Brasil. O seu potencial de uso será determinado, baseado nos dados disponíveis sobre prejuízos causados pelas doenças e consumo de fungicidas para o controle.

**Alface.** No cultivo hidropônico de alface, uma das principais limitações é a podridão de raízes causada por *Pythium aphanidermatum*, especialmente nas épocas mais quentes do ano. Aplicações de *Bacillus subtilis* em alface hidropônica mostraram redução na recuperação do patógeno em 17%, na inoculação artificial (mergulho das raízes em suspensão do patógeno) e 40%, na inoculação natural (fornecimento de inóculo por plantas inoculadas artificialmente) (Correa & Bettiol, 2007).

**Arroz.** A brusone, causada por *Pyricularia grisea* (sin. *Pyricularia oryzae*), é considerada a principal doença do arroz. No Brasil, sob infecção natural, estimativas de danos em algumas variedades revelaram redução de 60% na produtividade. O patógeno afeta todas as partes aéreas da planta, desde os estádios iniciais de desenvolvimento até a fase final de produção de grãos (Bedendo & Prabhu, 2005). Bettiol & Kimati (1989) observaram a ocorrência de grande número de microrganismos antagonísticos a *Pyricularia oryzae*, sendo *Bacillus subtilis* o mais eficiente.

**Café.** A ferrugem (*Hemileia vastatrix*) ataca as plantas de café em todas as regiões do mundo. No Brasil pode ser encontrada em todas as lavouras de café. Em condições favoráveis, os prejuízos atingem 35% e sob condições de estiagem prolongada, as perdas podem chegar a mais de 50%. Os principais danos são a queda precoce das folhas e a seca dos ramos. Em ensaios de avaliação de produtos orgânicos quanto ao efeito protetor e indutor de resistência à ferrugem do cafeeiro, comparando-se com fungicidas sistêmicos, Costa *et al.* (2007) verificaram que o tratamento com *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da ferrugem em mais de 90% em relação à testemunha (água), equiparando-se inclusive a outros tratamentos químicos.

**Citros.** A podridão floral dos citros (*Colletotrichum acutatum*) afeta flores e frutos recém-formados. Endêmica, constitui-se numa das mais importantes doenças fúngicas no Rio Grande do Sul e sudeste de São Paulo (Feichtenberger *et al.*, 2005). Kupper *et al.* (2003) testaram em laboratório 64 isolados de *Bacillus subtilis*, quatro isolados de *Bacillus* spp. e um isolado de *Bacillus thuringiensis* quanto à capacidade de inibir o desenvolvimento de *Colletotrichum acutatum* em cultura pareada e quanto à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. Todos isolados inibiram o crescimento micelial do patógeno. Sete dos isolados de *Bacillus subtilis* foram testados para o controle da doença em condições de campo. Neste caso, *Bacillus subtilis* ACB-69 mostrou maior eficácia de controle, equiparada estatisticamente a um fungicida químico, proporcionando menor porcentagem de flores com sintomas e maior número médio de frutos efetivos. Outra doença de importância para a cultura é a podridão radicular (*Phytophthora parasitica* e *Phytophthora citrophthora*), que pode provocar perdas significativas em viveiros de todas as regiões citrícolas. Atualmente, o seu controle é feito com fungicidas.

O antagonismo de *Bacillus subtilis* e de outros isolados bacterianos foi avaliado por meio da inibição do crescimento micelial e redução na percentagem de infecção da doença em mudas de citros, obtidas de sementes microbiolizadas com rizobactérias. A microbiolização de sementes pode constituir uma opção potencial para o controle de fitopatógenos habitantes do solo (Luz, 1993b). *Bacillus subtilis* foi um dos mais ativos inibidores do crescimento micelial de *Phytophthora*. Em condições de casa de vegetação, todos os isolados proporcionaram redução na percentagem de infecção da doença (Amorim, 2002).

**Crucíferas.** A podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) é a principal doença bacteriana das crucíferas. Se a cultura for infectada, recomenda-se a eliminação total (Marigoni, 2005), por isso o tratamento preventivo é fundamental. Assis *et al.* (1996) observaram que *Bacillus subtilis* R14 controlou completamente três isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em todo período de aplicação em couve, sugerindo uma utilização da bactéria como uso preventivo para a doença. Assis *et al.* (1997) confirmaram essa eficiência em ensaios de campo, onde o mesmo isolado promoveu a redução de 73% da doença em brócolis. Além do *Bacillus subtilis* R14, outras três espécies mostraram eficácia de controle, incluindo *Bacillus pumilus* C116. Em outro estudo, a partir de nove isolados de *Bacillus* testados *in vitro* contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, apenas quatro espécies mostraram atividade antibiótica, dentre elas *Bacillus pumilus* C116 e *Bacillus subtilis* R14 (Luna *et al.*, 2002).

**Cucurbitáceas.** A mancha aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) é responsável por grandes perdas de produção e depreciação dos frutos. Desde que Assis *et al.* (1999) relataram a ocorrência dessa doença no Rio Grande do Norte em 1997, têm sido assinaladas perdas entre 40 a 50%, atingindo até 100% em períodos chuvosos (Sales Júnior & Menezes, 2001). Os mesmos autores citam que as medidas eficientes para controle da doença são escassas e depois de introduzida em uma área, é de difícil erradicação. Em ensaios conduzidos *in vitro*, Santos *et al.* (2006), observaram que compostos lipopeptídicos produzidos por *Bacillus pumillus* C116 inibiram o crescimento do agente causal da mancha-aquosa em plântulas de melão por meio do tratamento de sementes, sugerindo a provável eficácia deste tratamento para prevenção da doença em campo. Oliveira *et al.* (2006) testaram 96 isolados bacterianos para controle da mancha aquosa em sementes pré-inoculadas com *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Dentre estes, *Bacillus subtilis* reduziu a severidade da doença e foi recomendado para o tratamento de sementes infectadas, isoladamente ou em combinação com outros agentes de controle. A podridão das raízes e do colo (*Fusarium solani*) em pepino, abóbora, melão e melancia ocasiona a morte de plantas quando em plantios consecutivos sob plasticultura. (Kurozawa *et al.*, 2005). De 18 isolados de bactérias da rizosfera de plantas sadias de pepino, três foram eficientes no antagonismo a *Fusarium solani*, sendo dois isolados de *Bacillus subtilis*. Em casa-de-vegetação, *Bacillus subtilis* 0G, controlou totalmente o patógeno (Melo & Valarini, 1995).

**Feijão.** A ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus*) pode causar danos severos quando ocorre precocemente na cultura. O controle por meio de resistência genética é prejudicado devido à grande variabilidade do agente causal (Bianchini *et al.*, 2005), portanto para seu controle utilizam-se fungicidas químicos. Baker *et al.*

(1983; 1985), citados por Bettiol & Ghini (1995), verificaram que um isolado de *Bacillus subtilis*, originário do solo, reduziu em 95% o número de pústulas da ferrugem do feijoeiro, quando aplicado em cultura líquida nas plantas, em casa de vegetação, duas a 120 h antes da inoculação de uredósporos de *Uromyces appendiculatus*. Em condições de campo, durante os anos de 1982 e 1983, observaram uma redução de, no mínimo, 75% na ocorrência da ferrugem com três aplicações semanais. Centurion (1991) obtiveram redução de 80 a 100% no número de pústulas de ferrugem com a aplicação de um isolado de *Bacillus subtilis*, em casa de vegetação. Mizubuti (1992) verificou redução significativa na germinação de uredósporos de *Uromyces appendiculatus* por cinco isolados de *Bacillus subtilis*. Verificou ainda redução do número de pústulas por folha quando os isolados foram aplicados até 48 h antes da inoculação com o patógeno, em casa de vegetação. Melo et al. (1995) constataram que *Bacillus subtilis* foi um potente antagonista contra patógenos de raízes de feijão, como *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

**Soja.** O nematóide do Cisto (*Heterodera glycines*) é considerada uma das principais doenças da soja e devido a ausência de controle químico eficiente, o controle biológico pode ser uma alternativa. Em estudos sobre a interferência de *Bacillus subtilis* em etapas do ciclo de vida de *Heterodera glycines* foi observado o efeito da bactéria no desenvolvimento do nematóide e na infecção de raízes. A presença de *Bacillus subtilis* reduziu a eclosão de ovos e o tratamento de raiz de soja com a bactéria inibiu a migração de larvas juvenis do nematóide para a planta. Nos ensaios de casa de vegetação, observou-se uma redução de fêmeas na raiz de soja quando o solo e sementes foram tratados previamente com o antagonista (Araújo et al., 2002). *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* são reportadas como as mais abundantes bactérias cultivadas na filosfera de plantas de soja (Arias et al., 1999), o que pode indicar o potencial da utilização desses microrganismos para o controle de outras doenças da parte aérea da cultura.

**Trigo.** O Mal-do-Pé (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) ocorre principalmente na região sul do país, caracterizada pela morte de plantas em reboleiras, cujo controle mais eficiente é a rotação de culturas (Reis & Casa, 2005). Em experimento de campo conduzido por Luz (1993a), *Bacillus subtilis* promoveu 98% de proteção contra a doença.

**Tratamento de sementes.** Devido à considerável dificuldade na inoculação de bactéria em larga escala no solo em campo, o tratamento de sementes com bactérias tem sido explorado para o controle de doenças. A eficácia de *Bacillus subtilis* no controle de patógenos associados às sementes foi demonstrada por Merriman et al. (1974), Venkatasubbaiah (1985), Reedy & Rahe (1989), Jindal & Thind (1990), Turner & Backman (1991), Lazzaretti (1993) e Luz (1993a). Uma formulação pó-molhável, à base de metabólitos e de células de *Bacillus subtilis*, foi testada para o tratamento de sementes de arroz, feijão, soja e trigo, visando a redução dos patógenos associados a estas. O nível de controle foi semelhante aos tratamentos com fungicidas recomendados para o controle de *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão; *Pyricularia oryzae* e *Rhizosporium sativum* em sementes de arroz e *Cercospora kikuchii*, *Phomopsis phaseoli* e *Fusarium* spp. em sementes de soja. Para *Dreschlera oryzae* em arroz e *Bipolaris sorokiniana*, *Pyricularia oryzae* e *Alternaria tenuis* em sementes de trigo, o tratamento com o produto, embora não tenha se igualado ao tratamento com o fungicida padrão, diferiu estatisticamente do tratamento testemunha (Lazzaretti & Bettiol, 1997).



A inoculação de sementes de soja com *Bacillus subtilis* 0G reduziu a incidência de *Rhizoctonia solani* em 65%, em casa-de-vegetação (Agostini *et al.*, 2007). Segundo Backman (1995), o isolado GB03 de *Bacillus subtilis* foi utilizado para tratamento de mais de 2 milhões de hectares de diversas culturas em 1994. Estima-se que este número, atualmente, seja bem maior, em função do aumento da disponibilidade de produtos no mercado mundial e dos resultados efetivos obtidos com o tratamento de sementes com o antagonista.

Além destes estudos no Brasil, há na literatura uma grande quantidade de relatos da eficiência de *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* contra diversos patógenos, especialmente fungos (Tabela 1). No controle de bactérias fitopatogênicas, os principais relatos são contra a podridão negra em crucíferas, causada por *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Wulff *et al.* 2002a,b; Massomo *et al.* 2004; Monteiro *et al.* 2005).

**Tabela 1.** *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* no controle de fungos fitopatogênicos.

Cultura	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Patógeno	Referência
abacate	<i>Rosellinia necatrix</i>	Cazorla <i>et al.</i> (2007)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Demoz & Korsten (2006)
	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	
	<i>Dothiorella aromatica</i>	
	<i>Thyronectria pseudotrachia</i>	
	<i>Phomopsis perseae</i>	
abobrinha	<i>Podosphaera xanthii</i>	Gilardi <i>et al.</i> (2008)
abricó	<i>Moniliana laxa</i>	Altindag (2006)
<i>Acer</i> spp.	<i>Verticillium dahlia</i>	<sup>(1)</sup> Hali <i>et al.</i> (1986)
alface	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Utkhede <i>et al.</i> (2000)
alfafa	<i>Fusarium graminearum</i>	Chan <i>et al.</i> (2003)
algodão	<i>Rhizoctonia solani</i>	<sup>(1)</sup> Kloeppe (1991)
<i>Amaranthus</i>	<i>Choanephora cucurbitarum</i>	Emoghene & Okigbo (2001)
arroz	<i>Aspergillus flavus</i>	Reddy <i>et al.</i> (2009)
batata	<i>Alternaria solani</i>	<sup>(2)</sup> Vasudeva & Chakravarti (1954)
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<sup>(2)</sup> Thirumalachar & O'Brien (1977)
	<i>Botryodiplodia solani-tuberosi</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Brewer & Larkin (2005)
		Schmiedeknecht <i>et al.</i> (1998)
beterraba	<i>Cercospora beticola</i>	Collins & Jacobsen (2003)
	<i>Pythium</i> sp.	Schmidt <i>et al.</i> (2004)
café	<i>Hemileia vastatrix</i>	<sup>(2)</sup> Bettioli <i>et al.</i> (1989)
cebola	<i>Sclerotium cepivorum</i>	<sup>(1)</sup> Utkhede & Rahe (1983)

Continua

**Tabela 1.** Continuação

Cultura	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Patógeno	Referência
cenoura	<i>Alternaria dauci</i>	Hernandez-Castillo <i>et al.</i> (2006)
cereja	<i>Monilinia fructicola</i>	<sup>(1)</sup> Utkhede & Sholberg (1986)
	<i>Alternaria alternata</i>	
citros	<i>Phytophthora citrophthora</i>	<sup>(2)</sup> Amorim (1997)
	<i>Phytophthora parasitica</i>	
	<i>Penicillium digitatum</i>	Leelasuphakul <i>et al.</i> (2008)
	<i>Penicillium italicum</i>	Obagwu & Korsten (2003)
colza	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Hu <i>et al.</i> (2005)
couve-flor	<i>Pythium ultimum</i>	Abdelzaher (2003)
cravo	<i>Fusarium reseau</i> f.sp. <i>dianthi</i>	<sup>(1)</sup> Baker & Aldrich (1970)
feijão	<i>Uromyces phaseoli</i>	<sup>(2)</sup> Centurion (1991)
fumo	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Maketon <i>et al.</i> (2008)
	<i>Cercospora nicotiana</i>	
gerânio	<i>Puccinia pelargonii-zonalis</i>	<sup>(1)</sup> Ryther <i>et al.</i> (1989)
grão-de-bico	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ciceris</i>	Hervas <i>et al.</i> (1998)
inhame	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Okigbo (2003)
	<i>Fusarium moniliforme</i>	
	<i>Penicillium sclerotigenum</i>	
	<i>Rhizoctonia</i> sp.	
	<i>Fusarium oxysporum</i>	Swain <i>et al.</i> (2008)
lentilha	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	
	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lentis</i>	El-Hassan & Gowen (2006)
lichia	<i>Peronophythora litchi</i>	Jiang <i>et al.</i> (2001)
	<i>Alternaria alternata</i>	Sivakumar <i>et al.</i> (2007)
	<i>Cladosporium</i> spp.	
maçã	<i>Phytophthora cactorum</i>	<sup>(1)</sup> Utkhede & Smith (1991)
		<sup>(2)</sup> Utkhede (1984)
	<i>Nectria galligena</i>	<sup>(2)</sup> Swinburne <i>et al.</i> (1975)
manga	<i>Botrytis cinerea</i>	Toure <i>et al.</i> (2004)
	<i>Oidium mangiferae</i>	Nofal & Haggag (2006)
melão	<i>Podosphaera fusca</i>	Romero <i>et al.</i> (2007)
milho	<i>Fusarium graminearum</i>	<sup>(2)</sup> Chang & Kommedahi (1968)
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Bacon <i>et al.</i> (2001)
	<i>Fusarium verticillioides</i>	Cavaglieri <i>et al.</i> (2005)
	<i>Aspergillus flavus</i>	Nesci <i>et al.</i> (2005)
mirtilo	<i>Monilinia vaccinii-corymbosi</i>	Dedej <i>et al.</i> (2004)
		Scherm <i>et al.</i> (2004)
morango	<i>Botrytis cinerea</i>	Helbig & Bochow (2001)
	<i>Podosphaera aphanis</i>	Pertot <i>et al.</i> (2008)

Continua

Tabela 1. Conclusão

Cultura	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Patógeno	Referência
mostarda	<i>Alternaria brassicae</i>	Sharma & Sharma (2008)
pepino	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Grosch <i>et al.</i> (1999)
	<i>Phytophthora nicotianae</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Kita <i>et al.</i> (2005)
	<i>Phomopsis sp.</i>	
pêra	<i>Monilinia fructicola</i>	<sup>(1)</sup> Pusey & Wilson (1984)
pêssego	<i>Monilinia fructicola</i>	<sup>(2)</sup> McKeen <i>et al.</i> (1986)
		Fan <i>et al.</i> (2000)
pimentão	<i>Phytophthora capsici</i>	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Ahmed <i>et al.</i> (2003)
	<i>Phytophthora capsici</i>	Lee <i>et al.</i> (2008)
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Nakkeeran <i>et al.</i> (2006)
pinus	<i>Ophiostoma picea</i>	Silva & Morrell (1998)
	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Singh <i>et al.</i> (2008)
rosa	<i>Botrytis cinerea</i>	Tatagiba <i>et al.</i> (1998)
soja	<i>Septoria glycines</i>	Mantecon (2008)
solo	<i>Rhizoctonia solani</i>	<sup>(1)</sup> Olsen & Baker (1968)
sorgo	<i>Pythium ultimum</i>	Idris <i>et al.</i> (2008)
tomate	<i>Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici</i>	Abd-Allah <i>et al.</i> (2007)
	<i>Phytophthora nicotianae</i>	Grosch & Grote (1998)
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Jayaraj <i>et al.</i> (2005)
	<i>Rhizoctonia solani</i>	Kondoh <i>et al.</i> (2000, 2001) Montealegre <i>et al.</i> (2003) Szczech & Shoda (2004)
trigo	<i>Bipolaris sorokiana</i>	<sup>(2)</sup> Luz (1994)
uva	<i>Eutypa lata</i>	<sup>(1)</sup> Ferreira <i>et al.</i> (1991)
	<i>Botrytis cinerea</i>	<sup>(2)</sup> Rodgers (1989)

<i>Bacillus pumilus</i>		
arroz	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pengnoo <i>et al.</i> (2000)
beterraba	<i>Cercospora beticola</i>	Bargabus <i>et al.</i> (2004)
citrus	<i>Penicillium digitatum</i>	<sup>(1)</sup> Huang <i>et al.</i> (1992)
grão-de -bico	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Akhtar & Siddiqui (2008)
maçã	<i>Venturia inaequalis</i>	Kucheryava <i>et al.</i> (1999)
morango	<i>Botrytis cinerea</i>	Swadling & Jeffries (1998)
trigo	<i>Puccinia spp.</i>	<sup>(1)</sup> Morgan (1963)
	<i>Gaeumannomyces graminis var. tritici</i>	<sup>(2)</sup> Capper & Campbell (1986)

<sup>(1)</sup>Referências citadas por Edwards *et al.* (1994). <sup>(2)</sup>Referências citadas por Melo (1998).

No levantamento de informações sobre as propriedades fungicidas e protetoras dessas espécies, foi observado que além de biocontroladores de fitopatógenos, *Bacillus* também são considerados promotores de crescimento de plantas. No Brasil, essa avaliação foi feita para plântulas de citros (Amorim, 2002), pepino (Melo & Valarini, 1995), alface (Correa & Bettioli, 2007) e trigo (Luz, 1993), entre outras. Essa característica agrega vantagens na utilização das bactérias na agricultura.

Um ponto importante a ser analisado como determinante no uso do controle biológico é a persistência dos microrganismos controladores e reaplicações. Collins *et al.* (2003), considerando a dificuldade em se desenvolver um biofungicida para doenças foliares devido às influências ambientais e com base nas hipóteses de colonização com um isolado de *Bacillus subtilis*, concluíram que, apesar de depender de nutrientes, o crescimento da colônia de bactérias não é influenciado pela quantidade de nutrientes disponível e também não depende dela para sua agregação.

Apesar de resultados positivos quanto ao antagonismo de *Bacillus* aos fungos fitopatogênicos, o controle das doenças não é satisfatório para todos os patossistemas e muitos devem ser testados no campo. Resultados inconsistentes quanto à eficiência do controle podem ser testados em um sistema de manejo integrado, utilizando mistura com fungicidas químicos ou agentes de controle biológico. O sinergismo pode ser mais eficiente e persistente que o controle realizado apenas com as bactérias (Shoda, 2000).

As interações entre os microrganismos e os fatores bióticos e abióticos influenciam na atuação e atividade de *Bacillus*. Respostas desiguais entre os tratamentos são prováveis, o que reflete a interferência dessas variáveis. A segurança e a eficácia da sua utilização serão determinadas em grande parte pelo sucesso ecológico das estirpes introduzidas no ambiente (McSpadden & Gardener, 2004). Por isso, são necessários estudos específicos nas condições brasileiras para garantia de eficiência dos isolados do antagonista.

A utilização de agentes de controle biológico deve estar relacionada com o manejo integrado, para que se tenha sucesso. Os produtos comerciais à base de *Bacillus*, podem servir como uma ferramenta de controle de fitopatógenos, em rotação com outros fungicidas químicos em cultivos convencionais. São também interessantes alternativas de controle de doenças em cultivos orgânicos, onde a oferta de produtos é escassa. Para o controle de fungos fitopatógenos, fungicidas são utilizados, não raro excessivamente, o que leva a problemas ambientais, econômicos e de saúde humana. Por isso, é importante adotar medidas alternativas de manejo (Maffia & Mizubuti, 2005).

Considerando a quantidade de ingrediente ativo, as culturas em destaque quanto ao uso de fungicidas químicos no Brasil são o café (3.680 t), a batata-inglesa (2.797 t), a soja (1.626 t) e o tomate envarado (1.125 t) (Sindag, 2000, disponível em Campanhola & Bettioli, 2003). Para essas, principalmente, e para outras culturas com uso intensivo de agroquímicos, verifica-se a necessidade de introdução de formas alternativas de controle de doenças, incluindo o controle biológico. Jacobsen *et al.* (2004) avaliaram a importância da utilização de *Bacillus*

spp. em manejo integrado de doenças, inclusive no manejo de resistência. Os autores enfatizam a necessidade da avaliação desses organismos em conjunto com outros métodos de controle, como cultivares resistentes, controle cultural, redução do uso de agrotóxicos, e com outros agentes de biocontrole.

## Produtos à Base de *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* no Brasil

Como consequência do crescimento do mercado para bioprodutos, tem-se verificado o surgimento de grande número de pequenas empresas desenvolvendo esforços para colocar esses agentes no mercado (Morandi *et al.*, 2005). Diante desse cenário, é imprescindível que se ampliem e aperfeiçoem os estudos nessa área, visando dar continuidade a esse crescimento com segurança, por meio da produção e comercialização de produtos de qualidade. Froyd (1997), em seus comentários sobre os investimentos em indústrias de agroquímicos em pesquisas e exploração de mercados na área de biopesticidas, incentiva o ingresso neste segmento, baseado nas vantagens de registro de produtos (menos custoso e trabalhoso), desenvolvimento do produto (mais rápido) e de ampliação de nichos de agricultores atingidos pela empresa.

No Brasil existem alguns produtos à base de *Bacillus subtilis* sendo comercializados para fins de controle de doenças de plantas ou como condicionadores de solo, entretanto, sem registro no Mapa.

Os produtos Serenade® (*Bacillus subtilis* isolado QST 713) e Sonata® (*Bacillus pumilus* isolado QST2808), produzidos pela Agraquest Inc., ambos registrados no “Environmental Protection Agency” (EPA, 2008) dos Estados Unidos da América estão sendo avaliados quanto à viabilidade de introdução no país. Os produtos possuem certificados orgânicos aprovados e estão em processo de registro nos órgãos federais.

Serenade® está registrado no Chile, Estados Unidos da América, México, Nova Zelândia, Porto Rico, Costa Rica, Japão, Israel, Filipinas, Guatemala, Honduras, Suíça, Argentina, França, Itália, Coreia do Sul, Equador e Peru e em fase de registro na Colômbia, Canadá, Espanha, Grécia, Alemanha, África do Sul, Reino Unido e Brasil. O produto é recomendado para mancha bacteriana, oídio e pinta-preta em tomate e pimentão; mofo-cinzento, oídio e podridão ácida em uva; oídio e crestamento gomoso em cucurbitáceas; Sigatoka negra em banana; antracnose em manga; podridão de *Sclerotinia* em alface; podridão de *Erwinia* em maçã e pêra e mofo-branco em feijão (Edgecomb & Manker, 2007).

Sonata® é registrado nos EUA e está em processo de registro na Coreia do Sul, México e Brasil. (Edgecomb & Manker, 2007). As culturas e doenças para as quais o produto é recomendado são: oídio em tomate, pimentão, uva, cucurbitáceas, morango, alface, maçã e pêra; pinta-preta e requeima em tomate e míldio em cucurbitáceas e alface.

## Aspectos Econômicos do Uso de *Bacillus* no Brasil

Para apoiar as decisões sobre a utilização dos biofungicidas em lavouras brasileiras é indispensável analisar os aspectos econômicos. Na Tabela 2 são apresentados os dados agrícolas brasileiros disponíveis para as culturas onde os produtos comerciais à base de *Bacillus* poderão ser utilizados.

**Tabela 2.** Produção, área e custos com fungicidas em lavouras brasileiras.

Cultura	Produção (mil t) <sup>(1)</sup>	Área (mil ha) <sup>(1)</sup>	Gastos com agrotóxicos (Milhões US\$) <sup>(3)</sup>
Amendoim	226	102	12,3
Arroz	11.045	2.962	121,9
Banana	7.021	498	10,3
Batata-inglesa	3.334	143	86,1
Café	2.131	2.318	233,5
Feijão	3.881	4.263	93,1
Citros	17.892	803	163,7
Maçã	949	36	30,8
Manga	842,3	67,6	*
Melão	352,3	16,9	9,8
Soja	56.700	20.700	2.286,0
Tomate	3.299	56	74,2
Trigo	3.464	1.754	126,7
Uva	1.297	75	21,1
Grãos <sup>(2)</sup>	126.476	45.531	13,6

<sup>(1)</sup>Área colhida. Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal e Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (fevereiro/07) - disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). Para manga e melão, os dados se referem à área plantada (Fonte: Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004). <sup>(2)</sup>Produtos: Algodão, Amendoim, Arroz, Aveia, Centeio, Cevada, Feijão, Girassol, Mamona, Milho, Soja, Sorgo, Trigo e Triticale. Fonte: Conab - Consolidado e Acompanhamento da Safra 2006/2007, 5º Levantamento ([www.conab.gov.br](http://www.conab.gov.br)) - disponível em [www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br). <sup>(3)</sup>Fonte: Sindag, 2008. \* Dado não disponível.

Em 2007, segundo dados do Sindag (2008), as vendas de fungicidas totalizaram R\$993,8 milhões, correspondente a 21,1% do total de defensivos agrícolas. A redução do uso de fungicidas sintéticos e o aumento do uso de produtos biológicos na prática agrícola só será viável se este último for eficiente e um custo que compense o seu uso.

A seguir é apresentada uma simulação feita para a ferrugem da soja, considerando-se uma redução de 50% no uso de fungicidas, com a aplicação de *Bacillus*. Dados experimentais preliminares (dados não publicados) indicam que esta redução do uso de fungicidas associado com a aplicação de um isolado de *Bacillus pumilus* promoveu controle satisfatório da doença.

O custo médio para o controle da ferrugem da soja com fungicidas, considerando quatro aplicações foi estimado em R\$112,36/ha, podendo ser maior ou menor em função dos fungicidas e equipamentos utilizados (dados calculados a partir de estimativa publicada em 27/11/2008 por Kadajah Suleiman, MTb RJ 22729JP - Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS e disponível em <http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2008/novembro/4a-semana/estimativas-aponam-reducao-de-custos-para-controlar-ferrugem-da-soja>).

Considerando 50% de redução do uso de fungicidas, e mantendo-se o custo médio por ha e eficiência semelhante, verifica-se que o custo médio de aplicação do controle biológico não deve exceder, em valores de hoje, a R\$56,18. Assim, para ser economicamente viável, o custo de um produto biológico contendo uma concentração mínima de  $1 \times 10^8$  UFC/ml com 85% de viabilidade e aplicado na proporção de 2 l/ha, em duas aplicações por safra, não deve exceder a R\$14,00/l.

É importante salientar que nesta simulação consideraram-se apenas os custos de substituição de produtos, mantendo-se as demais características de aplicação sem alteração. Também não foram considerados os aspectos não diretamente mensuráveis, como a redução da contaminação ambiental por resíduos dos fungicidas.

## Considerações Finais

Apesar da maioria dos estudos serem *in vitro* e em casa de vegetação, os resultados obtidos com *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilus* são promissores. Também a eficácia e utilização desses organismos no controle de fitopatógenos nas condições de cultivo são promissoras. Assim, há necessidade de testes em áreas agrícolas, para avaliação do seu potencial de controle de doenças em lavouras comerciais nas condições brasileiras e para refinamento das recomendações de manejo.

Com base nas informações descritas, as culturas e doenças promissoras, que inicialmente merecem ser melhor analisadas para desenvolvimento de produtos no Brasil são: soja (ferrugem asiática), tomate (mancha bacteriana e pinta-preta), café (ferrugem), cucurbitáceas (míldios e oídios), citros (podridão floral e podridão radicular), crucíferas (podridão negra) e para o tratamento de sementes em geral.

Com o desenvolvimento de novas pesquisas científicas nesse segmento e ao longo do desenvolvimento técnico-comercial, os produtos deverão ser testados também em outras culturas como: alface, maçã, banana, morango, uva, batata, arroz e trigo.

A partir do levantamento apresentado e da análise de eficiência e vantagens, pode-se concluir que o uso de *Bacillus* é promissor, tanto devido ao desempenho das bactérias em controlar fitopatógenos quanto à sua aceitação pelos agricultores brasileiros que procuram novas alternativas para o manejo de doenças, mais seguras ao ambiente e à saúde humana.

## Referências

- Abd-Allah, E.F.; Ezzat, S.M. & Tohamy, M.R. *Bacillus subtilis* as an alternative biologically based strategy for controlling Fusarium wilt disease in tomato: A histological study. *Phytoparasitica* 35: 474-478. 2007.
- Abdelzaher, H.M.A. Biological control of root rot of cauliflower (caused by *Pythium ultimum* var. *ultimum*) using selected antagonistic rhizospheric strains of *Bacillus subtilis*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 31: 209-220. 2003.
- Agostini, P.; Lotto, M.C.; Valarini, P.J. & Melo, I.S. Avaliação do potencial de *Bacillus subtilis* na proteção e no desenvolvimento da soja. Resumos, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas, SP. 2007. (Resumo).
- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 jan. 2009.
- Ahmed, A.S.; Ezziyyani, M.; Sanchez, C. P. & Candela, M. E. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109: 633-637. 2003.
- Akhtar, M. S. & Siddiqui, Z.A. *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of General Plant Pathology* 74: 53-60. 2008.
- Altindag, M.; Sahin, M.; Esitken, A.; Ercisli, S.; Guleryuz, M.; Donmez, M. F. & Sahin, F. Biological control of brown rot (*Monilinia laxa* Ehr.) on apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Hacihaliloglu) by *Bacillus*, *Burkholderia*, and *Pseudomonas* application under in vitro and in vivo conditions. *Biological Control* 38: 369-372. 2006.
- Amorim, E. P. da R. & Melo, I. S. Ação antagonística de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora*. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 565-568. 2002.
- Anuário Brasileiro da Fruticultura 2004. Santa Cruz do Sul. Editora Gazeta. 2004.
- Araújo, F.F.; Silva, J.F.V. & Araújo, A.S.F. Influência de *Bacillus subtilis* na eclosão, orientação e infecção de *Heterodera glycines* em soja. *Ciência Rural* 32: 197-202. 2002.
- Arias, R. S.; Sagardoy, M. A. & Van Vuurde, J. W. L. Spatiotemporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. *Journal of Basic Microbiology* 39: 283-292. 1999.
- Assis, S.M.P.; Mariano, R.L.R.; Michereff, S.J. & Coelho, R.S.B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: Wenhua, T.; Cook, R.J. & Rovira, A. (Eds.) *Advances in Biological Control of Plant Diseases*. Beijing. China Agricultural University Press. 1996. pp. 347-353.
- Assis, S.M.P.; Mariano, R.L.R.; Michereff, S.J.; Silva, G. & Maranhão, E.A.A. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in field. In: Ogoshi, A.; Kobayashi, Y.; Homma, Y.; Kodama, F.; Kondo, N. & Akino, S. (Eds.) *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Present Status and Future Prospects*. Sapporo. University of Hokaido/OECD. 1997. pp. 345-348.
- Assis, S.M.P.; Mariano, R.L.R.; Silva-Hanlin, D.M.W. & Duarte, V. Mancha-aquosa do melão causada por *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, no Estado do Rio Grande do Norte. *Fitopatologia Brasileira* 24: 191. 1999.
- Backman, P.A. Development and commercialization of *Bacillus subtilis* (GBO3) as a rhizosphere inoculant. In: Abstracts, 13. International Plant Protection Congress, 13. The Hague. 1995. Abstract 27.
- Bacon, C. W.; Yates, I.E.; Hinton, D. M. & Meredith, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspectives* 109: 325-332. 2001.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N.K.; Sherwood, J. E. & Jacobsen, B. J. Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control* 30: 342-350. 2004.
- Bedendo, I.P. & Prabhu, A.S. Doenças do arroz. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) *Manual de fitopatologia*. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 79-90.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Controle biológico. In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H. & Amorim, L. (Eds.) *Manual de fitopatologia*. Vol. 1. Princípios e conceitos, 3. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 1995. pp. 717-728.



- Bettiol, W. & Kimati, H. Seleção de microrganismos antagonísticos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle do brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). *Summa Phytopathologica* 15: 257-266. 1989.
- Bianchini, A.; Marigoni, A.C. & Carneiro, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 333-350.
- Brewer, M. T. & Larkin, R.P. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection* 24: 939-950. 2005.
- Campanhola, C. & Bettiol, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. (Eds.) Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 13-52.
- Cavaglieri, L.; Orlando, J.; Rodriguez, M. I.; Chulze, S. & Etcheverry, M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. *Research in Microbiology* 156: 748-754. 2005.
- Cazorla, F. M.; Romero, D.; Perez-Garcia, A.; Lugtenberg, B. J. J.; Vicente, A. & Bloemberg, G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. *Journal of Applied Microbiology* 103: 1950-1959. 2007.
- Chan, Y. K.; McCormick, W.A. & Seifert, K. A. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistic activities against *Fusarium* species. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 253-262. 2003.
- Collins, D. P. & Jacobsen, B.J. Optimizing a *Bacillus subtilis* isolate for biological control of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26: 153-161. 2003.
- Collins, D.P.; Jacobsen, B.J. & Maxwell, B. Spatial and temporal population dynamics of a phyllosphere colonizing *Bacillus subtilis* biological control agent of sugar beet cercospora leaf spot. *Biological Control* 26: 224-232. 2003.
- Coping, L.G. *The Manual of Biocontrol Agents - A World Compendium*. 3. Ed. Croydon. BCPC. 2004.
- Correa, E.B. & Bettiol, W. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em alface hidropônica com bactérias Gram positivas. Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas, SP. 2007. (Resumo).
- Costa, M.J.N.; Zambolim, L. & Rodrigues, F.A. Avaliação de produtos alternativos no controle da ferrugem do café. *Fitopatologia Brasileira* 32: 150-155. 2007.
- Dedej, S.; Delaphane, K.S. & Scherm, H. Effectiveness of honey bees in delivering the biocontrol agent *Bacillus subtilis* to blueberry flowers to suppress mummy berry disease. *Biological Control* 31: 422-427. 2004.
- Demoz, B. T. & Korsten, L. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. *Biological Control* 37: 68-74. 2006.
- Edgecomb, D.W. & Manker, D.C. Serenade (*Bacillus subtilis* strain QST 713) and Sonata (*Bacillus pumilus* strain QST 2808), new biological tools for integrated and organic disease control programs. Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas SP. 2007. (Resumo).
- Edwards, S.G.; McKay, T. & Seddon, B. Interaction of *Bacillus* species with phytopathogenic fungi - Methods of analysis and manipulation for biocontrol purposes. In: Blakeman, J.P. & Williamson, B. (Ed.) *Ecology of Plant Pathogens*. Wallingford. CAB International. 1994. pp. 101-118.
- El-Hassan, S.A. & Gowen, S.R. Formulation and delivery of the bacterial antagonist *Bacillus subtilis* for management of lentil vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis*. *Journal of Phytopathology* 154: 148-155. 2006.
- Emoghene, A.O. & Okigbo, R.N. Phylloplane microbiota of *Amaranthus hybridus* and their effect on shoot disease caused by *Choanephora cucurbitarum*. *Tropical Agriculture* 78: 90-94. 2001.
- EPA - Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides.htm>> . Acesso em: 15 jan. 2008.
- Fan, Q.; Tian, S.P.; Li, Y. X.; Xu, Y. & Wang, Y. Biological control of postharvest brown rot in peach and nectarine fruits by *Bacillus subtilis* (B-912). *Acta Botanica Sinica* 42: 1137-1143. 2000.

- Feichtenberger, E.; Bassanezi, R.B.; Spósito, M.B. & Belasque Jr., J. Doenças dos citros. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 239-270.
- Ferreira, J.H.S.; Matthee, F.N. & Thomas, A.C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 81: 283-287. 1991.
- Froyd, J.D. Can synthetic pesticides be replaced with biologically-based alternatives? - an industry perspective. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 19: 192-195. 1997.
- Gilardi, G.; Manker, D.C.; Garibaldi, A. & Gullino, M. L. Efficacy of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* and *Ampelomyces quisqualis* applied in combination with fungicides against powdery mildew of zucchini. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115: 208-213. 2008.
- Grosch, R. & Grote, D. Suppression of *Phytophthora nicotianae* by application of *Bacillus subtilis* in closed soilless culture of tomato plants. *Gartenbauwissenschaft* 63: 103-109. 1998.
- Grosch, R.; Junge, H.; Krebs, B. & Bochow, H. Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. *Journal of Plant Diseases and Protection* 106: 568-580. 1999.
- Helbig, J. & Bochow, H. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (isolate 25021) in controlling *Botrytis cinerea* in strawberry. *Journal of Plant Diseases and Protection* 108: 545-559. 2001.
- Hernandez-Castillo, F.; Aquirre-Aguirre, A.; Lira-Saldivar, R.; Guerrero-Rodriguez, E. & Gallegos-Morales, G. Biological efficiency of organic biological and chemical products against *Alternaria dauci* Kuhn and its effects on carrot crop. *Phyton-International Journal of Experimental Botany* 75: 91-101. 2006.
- Hervas, A.; Landa, B.; Datnoff, L. E. & Jimenez-Diaz, R. M. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. *Biological Control* 13: 166-176. 1998.
- Hu, X. J.; Roberts, D.P.; Jiang, M. L. & Zhang, Y. B. Decreased incidence of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and improved plant vigor of oilseed rape with *Bacillus subtilis* Tu-100. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68: 802-807. 2005.
- Huang, H.H.C. Biological control of soilborne diseases in Canada. *Proceedings, International Symposium on Clean Agriculture, Sapporo*. 1997. pp. 52-59.
- Idris, H. A.; Labuschagne, N. & Korsten, L. Suppression of *Pythium ultimum* root rot of sorghum by rhizobacterial isolates from Ethiopia and South Africa. *Biological Control* 45: 72-84. 2008.
- Jacobsen, B. J.; Zidack, N. K. & Larson, B. J. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. *Phytopathology* 94: 1272-1275. 2004.
- Jayaraj, J.; Radhakrishnan, N.V.; Kannan, R.; Sakthivel, K.; Suganya, D.; Venkatesan, S. & Velazhahan, R. Development of new formulations of *Bacillus subtilis* for management of tomato damping-off caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 15: 55-65. 2005.
- Jiang, Y. M.; Zhu, X.R. & Li, Y. B. Postharvest control of litchi fruit rot by *Bacillus subtilis*. *Food Science and Technology* 34: 430-436. 2001.
- Jindal, K.K. & Thind, B.S. Microflora of cowpea seeds and its significance in the biological control of seedborne infection of *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*. *Seed Science and Technology* 18: 393-403. 1990.
- Kalita, P.; Bora, L.C. & Bhagabati, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology* 49: 234-237. 1996.
- Kita, N.; Ohya, T.; Uekusa, H.; Nomura, K.; Manago, M. & Shoda, M. Biological control of damping-off of tomato seedlings and cucumber *Phomopsis* root rot by *Bacillus subtilis* RB14-C. *JARQ-Japan Agricultural Research Quarterly* 39: 109-114. 2005.
- Kondoh, M.; Hirai, M. & Shoda, M. Co-utilization of *Bacillus subtilis* and Flutolanil in controlling damping-off of tomato caused by *Rhizoctonia solani*. *Biotechnology Letters* 22: 1693-1697. 2000.
- Kondoh, M.; Hirai, M. & Shoda, M. Integrated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91: 173-177. 2001.
- Kucheryava, N.; Fiss, R.; Auling, G. & Kroppenstedt, R. M. Isolation and characterization of epiphytic bacteria from the phyllosphere of apple, antagonistic in vitro to *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. *Systematic and Applied Microbiology* 22: 472-478. 1999.
- Kupper, K.C.; Gimenes-Fernandes, N. & Goes, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira* 28: 251-257. 2003.

- Kurozawa, C.; Pavan, M.A. & Rezende, J.A.M. Doenças das cucurbitáceas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 293-302.
- Lazzaretti, E. & Bettiol, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado à base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. *Scientia Agricola* 54: 89-96. 1997.
- Lazzaretti, E. Controle de fungos transportados por sementes de trigo com *Bacillus subtilis*. Dissertação de Mestrado. Piracicaba SP. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 1993.
- Lee, K. J.; Kamala-Kannan, S.; Sub, H. S.; Seong, C. K. & Lee, G. W. Biological control of Phytophthora blight in red pepper (*Capsicum annuum* L.) using *Bacillus subtilis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 1139-1145. 2008.
- Leelasuphakul, W.; Hemmanee, P. & Chuenchitt, S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48: 113-121. 2008.
- Lopes, R.B. A indústria no controle biológico: produção e comercialização de microorganismos no Brasil. Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas, Campinas SP. 2007. (Resumo).
- Luna, C.L.; Mariano, R.L.R. & Souto-Maior, A.M. Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 19: 133-140. 2002.
- Luz, W. C. Microbiolização de sementes para o controle de doenças de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1: 33-77. 1993b.
- Luz, W.C. Controle microbiológico do mal-do-pé do trigo pelo tratamento de sementes. *Fitopatologia Brasileira* 13: 82-85. 1993a.
- Maffia, L.A. & Mizubuti, E.S.G. Controle alternativo de fungos. In: Venzon, M.; Paula Júnior, T.J. & Pallini, A. (Coords.) Controle Alternativo de Pragas e Doenças. Viçosa. EPAMIG/CTZM/UFV. 2005. pp. 269-294.
- 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* 39: 296-300. 2008.
- Mantecon, J. D. Efficacy of chemical and biological strategies for controlling the soybean brown spot (*Septoria glycines*). *Ciencia y Investigación Agraria* 35: 211-214. 2008.
- Maringoni, A.C. Doenças das crucíferas. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) Manual de Fitopatologia. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 285-292.
- Massomo, S. M. S.; Mortensen, C. N.; Mabagala, R. B.; Newman, M. A. & Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. *Journal of Phytopathology* 152: 98-105. 2004.
- McKeen, C.D.; Reilly, C.C. & Pusey, P.L. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76: 136-139. 1986.
- McSpadden Gardener, B. B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology* 94: 1252-1258. 2004.
- Melo, I. S.; Valarini, P.J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). *Scientia Agricola* 52: 326-330. 1995.
- Melo, I.S. Agentes microbianos no controle de fungos fitopatogênicos. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (Eds.) Controle Biológico. Vol.1. Jaguariúna. SP. EMBRAPA. 1998. pp. 17-67.
- Melo, I.S.; Valarini, P.J. & Faull, J.L. Controle biológico de *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* por *Bacillus subtilis* isolado da rizosfera do feijoeiro. *Fitopatologia Brasileira* 20: 342. 1995.
- Merriman, P.R.; Price, R.D.; Kollmorgen, J.F.; Piggott, T. & Ridge, E.H. Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. *Australian Journal of Agricultural Research* 25: 219-226. 1974.
- Mizubuti, E. S. G. Controle da ferrugem do feijoeiro com *Bacillus subtilis*. Dissertação de Mestrado. Viçosa MG. Universidade Federal de Viçosa. 1992.
- Montealegre, J. R.; Reyes, R.; Perez, L. M.; Herrera, R.; Silva, P. & Besoain, X. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 115-127. 2003.

- Monteiro, L.; Mariano R. D. R. & Souto-Maior, A. M. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 23-29. 2005.
- Morandi, M. A. B.; Bettiol, W. & Ghini, R. Situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil. In: Venzon, M.; Paula Júnior, T.J. & Pallini, A. (Coords.) *Controle Alternativo de Pragas e Doenças*. Viçosa. EPAMIG/CTZM/UFV. 2005. pp. 247-268.
- Nakkeeran, S.; Kavitha, K.; Chandrasekar, G.; Renukadevi, P. & Fernando, W. G. D. Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 16: 403-416. 2006.
- Nesci, A. V.; Bluma, R.V. & Etcheverry, M. G. In vitro selection of maize rhizobacteria to study potential biological control of *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxin production. *European Journal of Plant Pathology* 113: 159-171. 2005.
- Nofal, M. A. & Haggag, W.M. Integrated management of powdery mildew of mango in Egypt. *Crop Protection* 25: 480-486. 2006.
- Obagwu, J. & Korsten, L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology* 28: 187-194. 2003.
- Okigbo, R. N. Mycoflora of tuber surface of white yam (*Dioscorea rotundata* poir) and postharvest control of pathogens with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 156: 81-85. 2003.
- Oliveira, A.; Santos, M.H.M.; Silveira, E.B.; Gomes, A.M.A. & Mariano, R.L.R. Biocontrole da mancha-aquosa do melão pelo tratamento de sementes com bactérias epifíticas e endofíticas. *Horticultura Brasileira* 24: 373-377. 2006.
- Pengnoo, A.; Kusongwiriawong, C.; Nilratana, L. & Kanjanamaneesathian, M. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Biocontrol* 45: 245-256. 2000.
- Pertot, I.; Zasso, R.; Amsalem, L.; Baldessari, M.; Angeli, G. & Elad, Y. Integrating biocontrol agents in strawberry powdery mildew control strategies in high tunnel growing systems. *Crop Protection* 27: 622-631. 2008.
- Pomella, A.W.V. A utilização do controle biológico para grandes culturas - a experiência do grupo Sementes Farroupilha. *Anais, IX. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças em Plantas*, Campinas SP. 2007. (Resumo).
- Pusey, P.L. & Wilson, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 68: 753-756. 1984.
- Reddy, K. R.; Reddy, C. S. & Muralidharan, K. Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. *Food Control* 20: 173-178. 2009.
- Reedy, M.S. & Rahe, J.E. Growth effects associated with seed bacterization not correlated with populations of *Bacillus subtilis* inoculated in onion seedling rhizospheres. *Soil Biology and Biochemistry* 21: 373-378. 1989.
- Reis, E.M. & Casa, R.T. Doenças do trigo. In: Kimati, H.; Amorim, L.; Bergamin Filho, A. & Camargo, L.E.A. (Eds.) *Manual de Fitopatologia*. 4. Ed. São Paulo. Agronômica Ceres. 2005. pp. 631-638.
- Romero, D.; de Vicente, A.; Zeriuoh, H.; Cazorla, F. M.; Fernandez-Ortuno, D.; Tores, J. A. & Perez-Garcia, A. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon. *Plant Pathology* 56: 976-986. 2007.
- Sales Júnior, R. & Menezes, J.B. Mapeamento das Doenças Fúngicas, Bacterianas e Viróticas do Cultivo do Melão no Estado do RN. Mossoró. UFERSA. 2001. (Relatório Técnico).
- Santos, E.R.; Gouveia, E.R.; Mariano, R.L.R. & Souto-Maior, A.M. Biocontrol of bacterial fruit blotch of melon by bioactive compounds produced by *Bacillus* spp. *Summa Phytopathologica* 32: 376-378. 2006.
- Scherm, H.; Ngugi, H.K.; Savelle, A. T. & Edwards, J. R. Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. *Biological Control* 29: 199-206. 2004.
- Schmidt, C. S.; Agostini, F.; Simon, A. M.; Whyte, J.; Townend, J.; Leifert, C.; Killham, K. & Mullins, C. Influence of soil type and pH on the colonisation of sugar beet seedlings by antagonistic *Pseudomonas* and *Bacillus* strains, and on their control of *Pythium* damping-off. *European Journal of Plant Pathology* 110: 1025-1046. 2004.

- Schmiedeknecht, G.; Bochow, H. & Junge, H. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Journal of Plant Diseases and Protection* 105: 376-386. 1998.
- Sharma, N. & Sharma, S. Control of foliar diseases of mustard by *Bacillus* from reclaimed soil. *Microbiological Research* 163: 408-413. 2008.
- Shoda, M. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 89: 515-521. 2000.
- Silva, A. A. & Morrell, J.J. Inhibition of wood-staining *Ophiostoma picea* by *Bacillus subtilis* on *Pinus ponderosa* sapwood. *Material Und Organismen* 32: 241-252. 1998.
- Sinclair, J.B. & Hartman, G.L. Soybean rust. In: Hartman, G.L.; Sinclair, J.B. & Rupe, J.C. (Eds.) *Compendium of Soybean Diseases*. 4. Ed. St. Paul. American Phytopathological Society. 1999. pp. 25-26.
- SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>> Acesso em: 15 jan. 2008.
- Singh, N.; Pandey, P.; Dubey, R. C. & Maheshwari, D. K. Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 24: 1669-1679. 2008.
- Sivakumar, D.; Zeeman, K. & Korsten, L. Effect of a biocontrol agent (*Bacillus subtilis*) and modified atmosphere packaging on postharvest decay control and quality retention of litchi during storage. *Phytoparasitica* 35: 507-518. 2007.
- Sonoda, R.M. & Guo, Z. Effect of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. *Phytopathology* 86: S52. 1996. (Abstract).
- Swadling, I. R. & Jeffries, P. Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease. *Biocontrol Science and Technology* 8: 439-448. 1998.
- Swain, M. R.; Ray, R.C. & Nautiyal, C. S. Biocontrol efficacy of *Bacillus subtilis* strains isolated from cow dung against postharvest yam (*Dioscorea rotundata* L.) pathogens. *Current Microbiology* 57: 407-411. 2008.
- Szczzech, M. & Shoda, M. Biocontrol of *Rhizoctonia damping-off* of tomato by *Bacillus subtilis* combined with *Burkholderia cepacia*. *Journal of Phytopathology* 152: 549-556. 2004.
- Tatagiba, J. D. S.; Maffia, L.A.; Barreto, R. W.; Alfenas, A. C. & Sutton, J. C. Biological control of *Botrytis cinerea* in residues and flowers of rose (*Rosa hybrida*). *Phytoparasitica* 26: 8-19. 1998.
- Toure, Y.; Ongena, M.; Jacques, P.; Guiro, A. & Thonart, P. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology* 96: 1151-1160. 2004.
- Turner, J.T. & Backman, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 75: 347-353. 1991.
- Utkhede, R. S.; Levesque, C.A. & Dinh, D. *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 22: 138-144. 2000.
- Venkatasubbaiah, P. Efficacy of *Bacillus subtilis* as a biocontrol for rot of coffee pathogen. *Geobios* 12: 101-104. 1985.
- Weller, D.M. Biological control of rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407. 1988.
- Wulff, E. G.; Mguni C. M.; Mansfeld-Giese, K.; Fels, J.; Lubeck, M. & Hockenhull, J. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, B-subtilis and B-pumilus isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Plant Pathology* 51: 574-584. 2002a.
- Wulff, E. G.; Mguni, C. M.; Mortensen, C. N.; Keswani, C. L. & Hockenhull, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. *European Journal of Plant Pathology* 108: 317-325. 2002b.

## Capítulo 21

# Controle Biológico de *Bipolaris oryzae* no Arroz Irrigado

Juliane Ludwig & Andréa Bittencourt Moura

*Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil, e-mail: juludwig@yahoo.com.br;  
abmoura@ufpel.edu.br*

## Introdução

O arroz (*Oryza sativa*) é cultivado em todos os continentes, desempenhando papel estratégico tanto no aspecto econômico quanto no social. O Brasil está entre os dez maiores produtores do mundo, ocupando a mesma posição em consumo (Agrianual, 2008). O estado do Rio Grande do Sul é um dos principais produtores plantando na safra 2006/2007, aproximadamente, um milhão de hectares, onde foram colhidas 7,5 milhões de toneladas (IRGA, 2008). A região Sul do Brasil responde por cerca de 60% da produção nacional de arroz, onde o cultivo é feito, predominantemente, em áreas de várzea sob sistema irrigado. Esta forma de cultivo tem como principal vantagem a alta produtividade. No entanto, pode apresentar baixa rentabilidade devido à necessidade de um grande aporte de insumos, bem como a ocorrência de um número elevado de doenças, que comprometem tanto a produção e a qualidade dos grãos quanto a sanidade das sementes. Vários são os microrganismos associados às plantas e/ou sementes de arroz, sendo relatadas mais de oitenta doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides nesta cultura (Prabhu *et al.*, 1999).

Dentre as principais medidas preconizadas para o controle de doenças estão o uso de cultivares resistentes e a aplicação de fungicidas. O uso da resistência genética para o controle de doenças é uma medida altamente desejável, devido ao baixo custo e à alta eficiência. No entanto, cultivares de arroz, que exibam níveis aceitáveis de resistência, muitas vezes não estão disponíveis para comercialização ou têm sua vida útil reduzida em virtude do surgimento de novas raças de patógenos.

Existem diversos fungicidas registrados para o controle da maioria das doenças presentes na cultura do arroz, porém sua utilização eleva os custos de produção, polui o ambiente, ameaça a saúde do agricultor, além de pressionar a seleção de populações do patógeno resistentes a estes compostos químicos. Aliado a isso, há ainda a pressão da sociedade por alimentos sem resíduos de agrotóxicos, o que torna urgente a busca por alternativas no controle de doenças em cultivos de arroz.

Dentre as principais doenças no arroz destaca-se a brusone, causada por *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. [teleomorfo: *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr]. Seu ataque, nos estádios de plântula ou no perfilhamento, assim como infecções severas nas panículas, pode comprometer a produção (Ou, 1985). A ocorrência desta doença está associada às condições de temperatura amena, alta umidade relativa e grande pressão de inóculo na lavoura, sendo particularmente importante em cultivos irrigados no Centro-Oeste do Brasil, pois além de ser favorecida pelas condições climáticas, o manejo da água de irrigação geralmente é deficiente.

Danos cada vez maiores são relacionados à ocorrência da queima-das-bainhas, incitada por *Rhizoctonia solani* Kuhn [teleomorfo: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]. Esta doença causa redução da produtividade, devido, principalmente, à esterilidade de espiguetas e ao acamamento das plantas. O fungo é capaz de sobreviver no solo como estruturas de resistência (escleródios) que posteriormente são disseminadas pela água de irrigação, infectando folhas e bainhas, atingindo até a base da haste. O cultivo do arroz sucedido por hospedeiros deste fungo, como a soja ou pastagens, leva à continuidade do ciclo do patógeno e ao aumento de inóculo. Estas duas peculiaridades fazem com que os danos causados pela queima-das-bainhas sejam crescentes a cada ano.

A escaldadura causada por *Gerlachia oryzae* (Hashioka & Yokogi) W. Gams [(teleomorfo: *Monographella albescens* (Thümen) Parkinson, Sivanesan & C. Booth) (sinonímia: *Rhynchosporium oryzae*, *Microdochium oryzae*)] ocorre em níveis considerados altos em todas as regiões produtoras de arroz no Brasil, embora ainda não existam estimativas relativas aos prejuízos causados por essa enfermidade. Os principais danos referem-se à desuniformidade das lavouras (Prabhu & Bedendo, 1990) e à diminuição da área fotossintetizante (Webster & Grunnel, 1992).

A ocorrência de mancha-parda, causada por *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoem [teleomorfo: *Cochliobolus miyabeanus* (Ito & Kuribayashi) (sinonímia: *Drechslera oryzae*, *Helminthosporium oryzae*)], está crescendo devido ao uso de cultivares com maior grau de suscetibilidade, tendo assumido posição de doença economicamente importante, surgindo como principal doença do arroz em algumas regiões. Os seus danos vão desde redução no percentual de germinação, no estabelecimento de plantas e na área fotossintetizante, até manchas nos grãos que, além de depreciarem o produto, geram perdas durante o beneficiamento.

Os prejuízos causados por doenças em arroz ocorrem tanto em zonas temperadas quanto tropicais, principalmente onde o seu cultivo utiliza grandes quantidades de fertilizantes e cultivares com alto índice de perfilhamento. Devido à limitação do emprego de cultivares resistentes, bem como aos aspectos econômicos e ambientais associados ao controle químico, pesquisas estão sendo realizadas na busca de tecnologias alternativas. Diante desse cenário, o controle

biológico, pela microbiolização das sementes, aparece como uma alternativa viável. Chatergee *et al.* (1996), Vidhyasekaran *et al.* (1997), Krishnamurthy & Gnanamaniackam (1998), Nandakumar *et al.* (2001), Commare *et al.* (2002) e Wiwattanapatapee *et al.* (2004) relatam o potencial de isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus* para o controle da brusone e da queima-das-bainhas. No entanto, estudos sobre o controle biológico da mancha-parda em arroz, pelo uso de microrganismos, ainda são escassos.

Existe um grande número de estudos sobre o controle biológico da queima-das-bainhas. Esse fato, possivelmente se deve as dificuldades de seu controle pela presença de formas de resistência do patógeno, ampla gama de hospedeiros, ausência de fungicidas registrados e cultivares resistentes disponíveis no mercado. Produtos formulados à base de *Pseudomonas fluorescens* apresentaram resultado similar ao fungicida Carbendazim quando os agentes foram aplicados, simultaneamente em sementes, raízes, solo e folhas (Rabindran & Vidhyasekaran, 1996; Nandakumar *et al.*, 2001). Uma formulação granulada de *Bacillus megaterium* aplicada via foliar mostrou-se eficiente no controle da doença em comparação ao fungicida Iprodione (Wiwattanapatapee *et al.*, 2007).

Para a brusone, em ensaios conduzidos em casa-de-vegetação e no campo, Chatergee *et al.* (1996) observaram que o isolado PF714 de *Pseudomonas fluorescens* foi mais eficiente que o fungicida Tricyclazole. Também foi possível observar redução na intensidade da doença quando as sementes e as plantas foram tratadas com *Pseudomonas fluorescens* Pf1. No campo, após quatro anos de experimentos, Vidhyasekaran *et al.* (1997) observaram a estabilidade desse biocontrole, quando na maioria dos anos, sua eficiência foi superior à proporcionada pelo fungicida Carbendazim. Também para a galha das raízes, causada por *Meloidogyne graminicola* Golden & Birchfield, o controle biológico é importante, devido à ineficiência do controle químico e à inexistência de cultivar resistente, sendo que Padgham e Sikora (2007) observaram que *Bacillus megaterium* reduziu a eclosão de ovos (*in vitro*), o número de galhas e a penetração de juvenis de segundo estágio (J2) nas raízes, em comparação ao nematocida Fosthiazate.

## **Controle Biológico de *Bipolaris oryzae* em Arroz Irrigado com Bactérias**

Os experimentos visando ao biocontrole da mancha-parda tiveram início com a seleção dos isolados bacterianos realizada por Moura *et al.* (1998). Em bioensaio conduzido em caixas do tipo Gerbox®, plaqueando sementes artificialmente infestadas por *Bipolaris oryzae* e microbiolizadas com bactérias, os autores verificaram a redução da incidência do patógeno, selecionando oito dentre 185 isolados: DFs185 (*Pseudomonas synxatha*), DFs223 (*Pseudomonas fluorescens*), DFs306 (não identificado), DFs416, DFs418 e DFs419 (*Bacillus* sp.), DFs422 (*Bacillus subtilis*) e DFs471 (*Stenotrophomonas maltophilia*). Os isolados fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Pelotas.



A presença de mais de um mecanismo de ação em um mesmo agente de biocontrole é uma característica favorável para a eficiência, estabilidade e inespecificidade do controle. Neste sentido, vários experimentos foram realizados para selecionar um ou mais isolados eficientes e com mais de um mecanismo de ação.

Os isolados selecionados foram capazes de produzir compostos tóxicos capazes de inibir o crescimento micelial (ação por antibiose) dos patógenos: *Bipolaris oryzae*, *Gerlachia oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata* (Soares *et al.*, 2007), e *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* (Schaffer *et al.*, 2007) (Tabela 1). A redução da eclosão de ovos e aumento da mortalidade de juvenis (J2) de *Meloidogyne graminicola* também podem ter sido influenciadas pela produção desses compostos (Ludwig *et al.*, 2008).

Os isolados DFs223, DFs416 e DFs418 também produziram enzimas proteolíticas e/ou lipolíticas (Ludwig *et al.*, 2006) que possivelmente participaram do biocontrole, uma vez que podem comprometer a integridade física das formas juvenis e dos ovos de nematóides (Park *et al.*, 2002), reduzindo a eclosão de ovos e causando mortalidade de juvenis (J2) (Ludwig *et al.*, 2008) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Inibição do crescimento micelial de fungos patogênicos ao arroz e porcentagem de redução da eclosão de ovos e mortalidade de juvenis (J2) de *Meloidogyne graminicola* por agentes de biocontrole

	DFs185	DFs223	DFS306	DFs416	DFS418
<i>Bipolaris oryzae</i>	+	+	-	+	+
<i>Gerlachia oryzae</i>	+	+	+	+	+
<i>Pyricularia oryzae</i>	-	+	-	+	+
<i>Alternaria alternata</i>	+	+	+	+	+
<i>Curvularia lunata</i>	+	+	+	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+	na	na	na
<i>Sclerotium rolfsii</i>	-	-	na	na	na
Redução da eclosão de ovos	21,8%	21,5%	22%	22%	22,7%
Mortalidade de J2	47,5%	44,5%	39,5%	53,5%	40%

(+) inibição do crescimento micelial; (-) presença de crescimento micelial; (na) não avaliado

Experimentos *in vitro* permitiram visualizar a colonização do sistema radicular após microbiolização de sementes de 14 cultivares de arroz com os antagonistas. Noventa por cento das combinações agente de biocontrole-cultivar resultaram em colonização das raízes, evidenciando o potencial competitivo dos isolados selecionados (Silveira *et al.*, 2001; Zanatta *et al.*, 2004; Schaffer *et al.*, 2005) (Tabela 2). Os isolados DFs185, DFs223 e DFs418 também foram capazes de produzir sideróforos (Ludwig *et al.*, 2006), portanto, aventa-se que a competição possa ser um dos mecanismos pelos quais esses isolados agem.

**Tabela 2.** Colonização do sistema radicular de plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas por agentes de biocontrole.

<b>Cultivar</b>	<b>DFs185</b>	<b>DFs223</b>	<b>DFs306</b>	<b>DFs416</b>	<b>DFs418</b>
BRS7-Taim	+	+	+	+	+
BR-IRGA 413	+	-	+	+	-
BR-IRGA 414	-	+	+	-	+
BRS Agrisul	+	+	+	-	-
El Passo L144	+	+	+	+	+
Epagri 108	+	+	+	+	+
BRS Formosa	+	+	+	+	+
BR-IRGA 411	+	+	+	+	+
BRS Ligeirinho	+	+	+	+	+
BRS Atalanta	+	+	+	+	+
BRS Bojuru	+	+	+	+	+
BRS 6-Chuí	+	+	+	+	+
BRS Firmeza	+	+	+	+	+
BRS Pelota	+	+	+	+	+

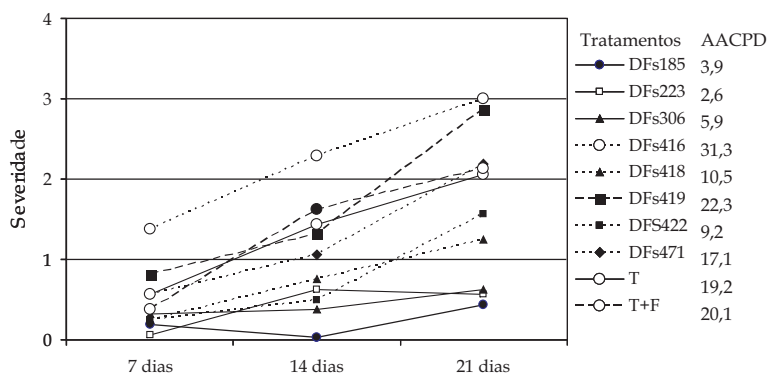
(+) presença de colonização; (-) ausência de colonização

## **Estabilidade dos Antagonistas em Casa-de-vegetação**

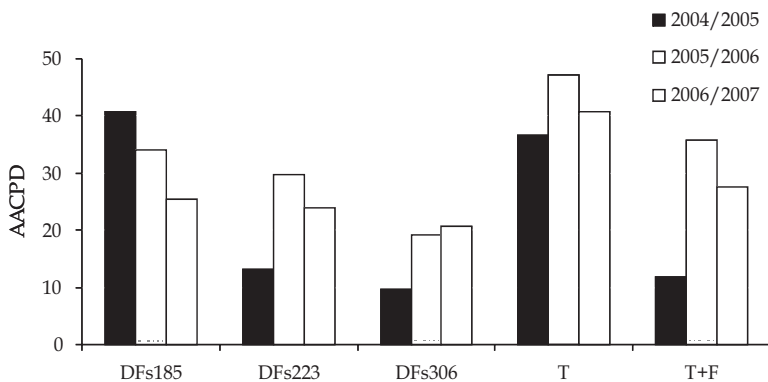
A microbiolização das sementes foi a metodologia empregada para dispensar os antagonistas. Para tanto, as sementes foram imersas em suspensões dos isolados, com 24 h de crescimento, sob agitação durante 30 min a 10 °C. Como testemunha, utilizaram-se sementes imersas em solução salina. Adicionalmente foi utilizado um tratamento com fungicida, onde sementes foram imersas em solução salina mais o fungicida Carboxin + Thiran (3 ml/kg de sementes). As inoculações do patógeno foram realizadas por aspersão de esporos ( $10^5$  conídios/ml). A severidade da doença nas plantas foi avaliada após 7, 14 e 21 dias da inoculação e foram calculadas as áreas abaixo das curvas de progresso da doença (AACPD).

No primeiro ensaio realizado foram utilizados oito isolados de antagonistas e as plantas foram inoculadas em estágio de desenvolvimento inicial V4 (início do perfilhamento), sendo selecionados os isolados DFs185, DFs223 e DFs306 como os que apresentaram o maior potencial de controle da mancha-parda, chegando a 80, 86 e 70% de controle, respectivamente (Ludwig *et al.*, 2004) (Figura 1).

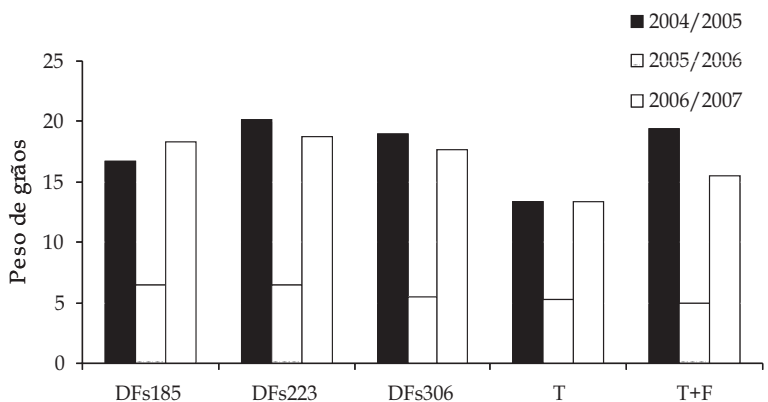
Os ensaios subsequentes foram realizados em três anos agrícolas consecutivos e conduzidos até a produção, utilizando os isolados DFs185, DFs223 e DFs306. As plantas foram inoculadas em estágio reprodutivo R3 (emborrachamento), sendo possível observar, desta forma, que houve estabilidade do efeito dos antagonistas, principalmente pelo isolado DFs306. Reduções significativas foram observadas na severidade da doença (Figura 2) bem como incrementos significativos na produção (Figura 3) (Ludwig *et al.*, 2007d).



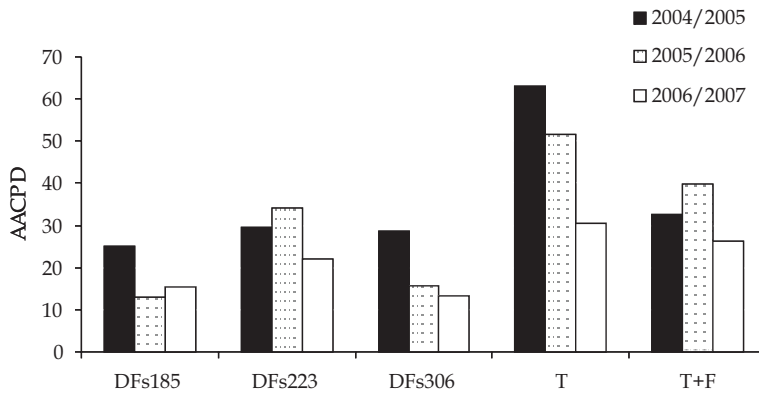
**Figura 1.** Severidade da mancha-parda (*Bipolaris oryzae*), de acordo com a porcentagem de área foliar afetada, em plantas originadas de sementes microbiolizadas com antagonistas aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação. AACPD=área abaixo da curva de progresso da doença, T= testemunha, T+F= fungicida Carboxin+Thiran.



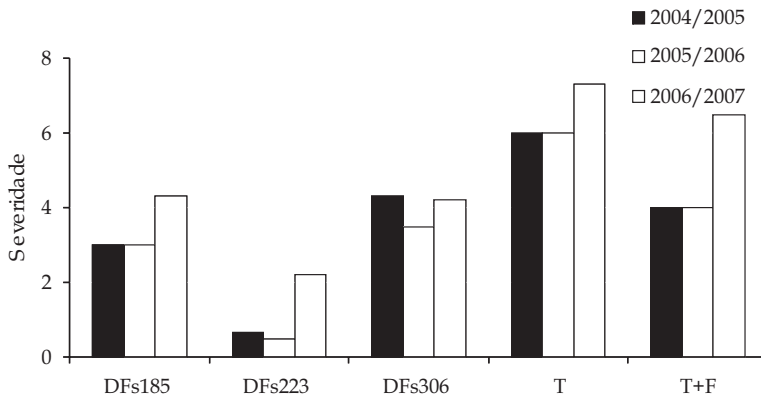
**Figura 2.** Severidade da mancha-parda, expressa em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em plantas originadas de sementes microbiolizadas com os antagonistas e inoculadas com *Bipolaris oryzae*, em avaliações realizadas em três anos agrícolas consecutivos. T= testemunha, T+F= fungicida Carboxin+Thiran.



**Figura 3.** Produção de grãos (g) por planta originada de semente microbiolizada com antagonistas e inoculada com *Bipolaris oryzae*, em avaliações realizadas em três anos agrícolas consecutivos. T= testemunha, T+F= fungicida Carboxin+Thiran.



**Figura 4.** Severidade da escaldadura, expressa em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), em plantas originadas de sementes microbiolizadas com os antagonistas e inoculadas com *Gerlachia oryzae*, em avaliações realizadas em três anos agrícolas consecutivos. T= testemunha, T+F= fungicida Carboxin+Thiran.



**Figura 5.** Severidade da queima-das-bainhas, expressa em nota segundo intensidade de sintomas e porcentagem de área infectada, em plantas originadas de sementes microbiolizadas com os antagonistas e inoculadas com *Rhizoctonia solani*, em avaliações realizadas em três anos agrícolas consecutivos. T= testemunha, T+F= fungicida Carboxin+Thiran.

**Tabela 3.** Número de galhas e de ovos por raiz, e fator de reprodução de *Meloidogyne graminicola* em plantas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com bactérias antagonicas e conduzidas em solo infestado por suspensão de ovos e juvenis.

Tratamento	Número de galhas	Número de ovos	Fator de reprodução
DFs185	219,0d*	244.555b	48,9b
DFs223	163,7f	236.388b	47,7b
DFs306	261,8c	270.666b	54,1b
DFs416	196,0e	258.388b	51,9b
DFs418	261,8c	289.444b	57,9b
DFs419	266,3c	272.277b	54,5b
DFs422	352,2b	259.611b	51,9b
DFs471	278,2c	275.444b	55,1b
Testemunha**	427,3a	370.000a	74,0a

\*médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si (Tukey 5%); \*\* sementes tratadas com solução salina

## Inespecificidade de Controle

A inespecificidade do controle foi avaliada inoculando-se plantas de arroz com *Gerlachia oryzae*, *Rhizoctonia solani* e *Meloidogyne graminicola*. Para todos os ensaios, a metodologia de dispensa dos biocontroladores foi a microbiolização das sementes. O fungo *Gerlachia oryzae* foi inoculado de forma semelhante ao estudo anterior, na concentração de inóculo de  $10^4$  conídios/ml. A avaliação seguiu a metodologia descrita anteriormente. Para *Rhizoctonia solani* a inoculação consistiu na infestação mensal do solo com substrato colonizado por micélio do patógeno, sendo que na avaliação de severidade, que ocorreu quando as plantas encontravam-se no estágio de maturação fisiológica (R7), foi atribuída uma nota de acordo com a intensidade de sintomas e porcentagem de área infectada (Internacional, 1975). Para inocular *Meloidogyne graminicola*, foi utilizada uma suspensão de 5.000 ovos + juvenis quando as plantas encontravam-se no início do perfilhamento (V4) e as avaliações foram realizadas após 50 dias.

Nas Figuras 4 e 5, verifica-se em casa-de-vegetação, por três anos agrícolas consecutivos, a eficiência e a inespecificidade dos antagonistas estudados. Na maioria dos anos, os níveis de controle alcançados com o uso destes isolados superaram aos do tratamento com os fungicidas Carboxin+Thiran. Observou-se, à semelhança do que ocorreu para a mancha-parda, que houve estabilidade de controle, uma vez que os antagonistas possibilitaram a redução da severidade da escaldadura e da queima-das-bainhas ao longo de três anos de avaliações (Ludwig *et al.*, 2007d). A mesma tendência foi verificada para o nematóide *Meloidogyne graminicola* com redução média de 24,8% nas variáveis avaliadas (Tabela 3) (Ludwig *et al.*, 2007b).

## Indução de Resistência

Considerou-se que os isolados selecionados poderiam atuar por indução de resistência, pois preenchem alguns dos critérios estabelecidos por Steiner e Schönbeck (1995): inespecificidade da proteção, separação física e temporal entre indutor e patógeno desafiador, bem como a necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência. Para tanto, foi instalado um experimento, em casa-de-vegetação, onde os antagonistas foram dispensados via microbiolização de sementes e as plantas inoculadas com *Bipolaris oryzae* no estágio de emborrachamento (R3). No momento da inoculação e sete dias após, foi retirada a folha imediatamente abaixo da folha bandeira para a quantificação da atividade específica de peroxidases. Paralelamente, nessas mesmas plantas, foi avaliada a severidade da doença. Houve maior controle da doença proporcionado pelo isolado DFs306, bem como aumento na atividade da enzima quando as plantas foram tratadas com este isolado (Tabela 4) (Ludwig *et al.*, 2007a). Assim, foi possível associar a maior atividade específica da enzima à redução da doença nas plantas tratadas com o antagonista, comportamento típico de plantas cuja resistência foi induzida.

**Tabela 4.** Severidade da mancha-parda expressa em área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e atividade específica de peroxidases (nkat/mg de proteína solúvel total), em folhas de arroz originadas de sementes microbiolizadas com os antagonistas e inoculadas com *Bipolaris oryzae*

	DFs185	DFs223	DFs306	T	T+F
AACPD	34,1b*	29,75bc	19,25c	47,25a	35,9ab
Atividade de peroxidases	0,105b	0,110b	0,252a	0,122b	0,111b

\*médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si (Tukey 5%); T= testemunha, T+F= fungicidas Carboxin+Thiran.

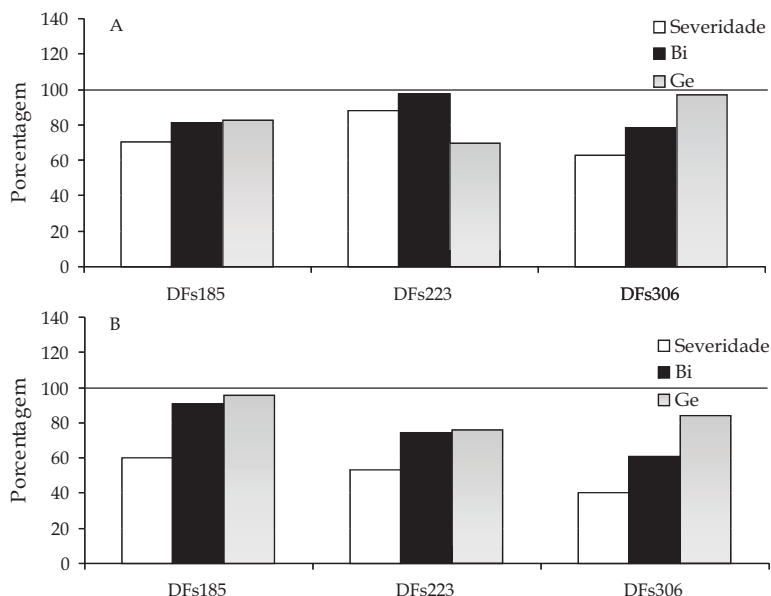
## Redução do Inóculo Inicial e da Transmissão de Patógenos por Sementes

Amostras de sementes natural e altamente infestadas/infetadas por *Bipolaris oryzae* e *Gerlachya oryzae* foram microbiolizadas e colocadas para germinar em copos de 50 ml contendo substrato autoclavado. Após 21 dias, foram atribuídas notas a cada planta de acordo com a intensidade dos sintomas segundo escala desenvolvida por Farias (2007). Adicionalmente, as sementes que não germinaram foram retiradas do substrato e submetidas à câmara úmida para verificar a incidência dos patógenos na superfície das sementes. Germinação, comprimento da parte aérea e do sistema radicular também foram avaliados.

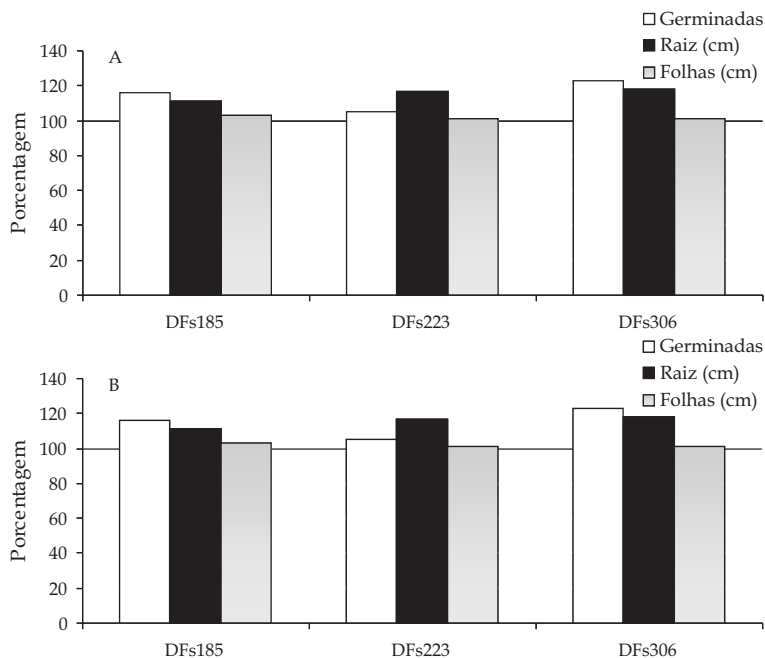
Todos os antagonistas reduziram a transmissão dos patógenos da semente para a planta, bem como a incidência em sementes não germinadas. O isolado DFs306, em ambas as amostras, reduziu a intensidade da doença na parte aérea em até 60% e a incidência de *Bipolaris oryzae* nas sementes não germinadas em até 26%. Por outro lado, a maior redução da incidência de *Gerlachya oryzae* foi proporcionada pelo isolado DFs223, chegando a 30% (Figura 6). Associado ao biocontrole observou-se efeito promotor de crescimento tanto em relação ao número de sementes germinadas, quanto em relação ao vigor das plantas (Figura 7) (Ludwig *et al.*, 2005).

## Promoção de Crescimento

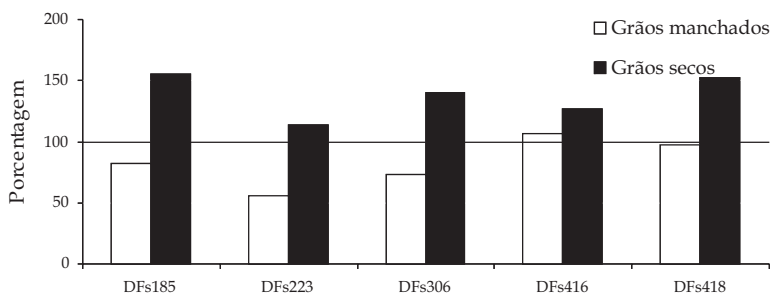
O potencial dos isolados dos agentes de biocontrole em promover o crescimento de plantas de arroz foi estudado em casa-de-vegetação microbiolizando as sementes. As plantas foram avaliadas, em cinco ocasiões, a cada 30 dias, quanto à altura, número de folhas e de perfilhos, massa da parte aérea e radicular, área foliar e, nas duas últimas avaliações, quanto aos componentes de produção. Foi observado crescimento inicial maior nas plantas microbiolizadas (dados não mostrados), embora, ao final das avaliações não se tenha observada essa diferença. Por outro lado, as bactérias selecionadas aumentaram a massa de grãos secos e reduziram o número de grãos manchados (Figura 8) (Santos *et al.*, 2001).



**Figura 6.** Transmissão de fungos pelas sementes expressa em severidade de manchas em plantas emergidas e incidência de *Bipolaris oryzae* (Bi) e *Gerlachia oryzae* (Ge) em sementes de arroz não germinadas. Ensaio conduzido por microbiolização de sementes com incidência natural de *Bipolaris* e *Gerlachia* em 28 e 36% (A) e 8 e 82% (B), respectivamente. Dados expressos em relação à testemunha (T) considerada como 100%.



**Figura 7.** Número de sementes germinadas, comprimento de raízes e comprimento de folhas. Ensaio conduzido por microbiolização de sementes com incidência natural de *Bipolaris oryzae* e *Gerlachia oryzae* em 28 e 36% (A) e 8 e 82% (B), respectivamente. Dados expressos em relação à testemunha (T) considerada como 100%.



**Figura 8.** Número de grãos manchados e peso de grãos secos (g) produzidos por plantas originadas de sementes microbiolizadas com os agentes de biocontrole. Dados expressos em relação à testemunha (T) considerada como 100%.

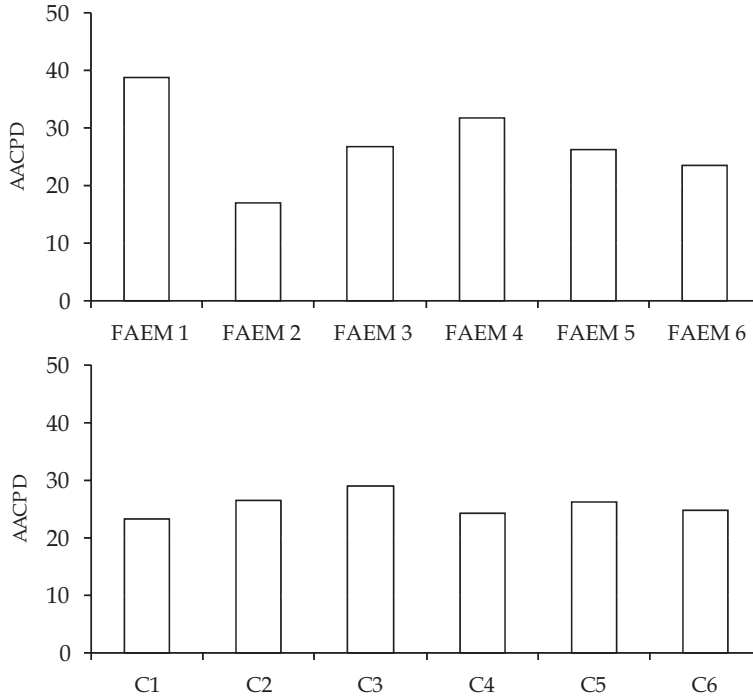
## Biocontrole de Isolados de *Bipolaris* em Cultivares de Arroz

Nesse estudo verificou o espectro de ação dos antagonistas quando foram utilizados na microbiolização de sementes de diversos cultivares, bem como quando houve desafio por diferentes isolados de *Bipolaris*. Todas as plantas foram inoculadas ao atingirem o estágio de início do perfilhamento (V4), por aspersão de esporos na concentração de  $1 \times 10^5$  conídios/ml. A avaliação ocorreu aos 7, 14 e 21 dias após a inoculação, sendo dada uma nota em relação à severidade na terceira folha. Com os dados foram calculadas as áreas abaixo das curvas de progresso da doença (AACPD). Para avaliar o comportamento dos bioagentes quando associados por microbiolização a diferentes cultivares, utilizaram-se aquelas com variados graus de resistência e amplamente cultivadas (BR IRGA 410, BRS Querência, BRS Pelota, BR IRGA 417, BR IRGA 422CL e Qualimax) e inoculadas com um isolado de *Bipolaris oryzae*. Para avaliar o comportamento dos bioagentes quando desafiados por diferentes isolados do patógeno, utilizou-se uma cultivar suscetível e foram inoculados, individualmente, isolados de *Bipolaris* oriundos de diferentes localidades do estado do Rio Grande do Sul: Cachoeirinha, Pelotas, Uruguaiana, Camaquã, Rio Grande e Mostardas.

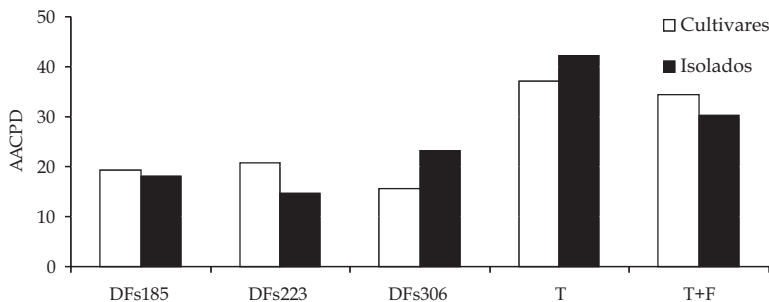
Observou-se que o controle variou entre os isolados de *Bipolaris* e as cultivares avaliadas. Houve comportamento diferenciado entre os isolados do patógeno, sendo que o controle foi maior no oriundo de Pelotas (FAEM 2) (Figura 9A). O maior controle foi observado nas cultivares BR IRGA 410 (C1) e BR IRGA 417 (C4) (Figura 8B). O isolado bacteriano mais eficiente em controlar *Bipolaris oryzae*, quando associado a todas as cultivares testadas, foi DFs306 sendo possível observar, em média, 58% de controle (Figura 10). Por outro lado, o isolado DFs223 foi o de melhor desempenho quando desafiado pelos seis isolados patogênicos, alcançado, em média, 65% de controle (Figura 9B) (Ludwig *et al.* 2007c).



Observando os resultados dos dois ensaios, pode-se afirmar que os agentes de biocontrole são eficientes para populações distintas do patógeno, pois quando desafiados por diferentes isolados do patógeno, apresentaram estabilidade de controle. Também foi verificado que os agentes foram eficientes no controle da doença em diferentes cultivares.



**Figura 9.** Efeito dos isolados dos agentes de biocontrole quando desafiados por diferentes isolados de *Bipolaris oryzae* (A) e em diferentes cultivares de arroz (B). Origem dos isolados utilizados: FAEM 1= Cachoeirinha, FAEM 2= Pelotas, FAEM 3=Uruguaiana, FAEM 4=Camaquã, FAEM 5= Rio Grande, FAEM 6= Mostardas. Cultivares utilizadas: C1= BR IRGA 410, C2= BRS Querência, C3= BRS Pelotas, C4= BR IRGA 417, C5= BR IRGA 422CL, C6= Qualimax



**Figura 10.** Área abaixo da curva do progresso da doença quando os biocontroladores foram microbiolizados às sementes de arroz, associados a diferentes cultivares ou quando plantas de arroz originadas da cultivar El Passo L144 foram inoculadas com isolados de *Bipolaris oryzae*.

## Considerações Finais

*Pseudomonas synxatha* (DFs185), *Pseudomonas* (DFs223) e DFs306 (não identificado) apresentam alto potencial de biocontrole, principalmente quando se pensa em associá-los a outras práticas de controle de doenças. Evidências deste potencial são sustentadas pela capacidade destes isolados atuarem por mais de um mecanismo de ação, além de apresentarem eficiência, estabilidade e inespecificidade de controle. Trabalhos a serem realizados no campo e a busca de uma formulação que facilite a dispensa e uma adequada vida de prateleira, bem como incrementalmente a eficiência, são metas a serem cumpridas para a transferência dessa tecnologia ao agricultor.

## Referências

- Agriannual. Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo. FNP – Consultoria & Comércio. 2008. pp.186-191.
- Chatterjee, A.; Valasubramanian, R.; Ma, W.-L.; Vachhani, A.K.; Gnanamanickam, S. & Chatterjee, A.K. Isolation of ant mutants of *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14 altered in antibiotic production, cloning of ant<sup>+</sup> DNA, and evaluation of the role of antibiotic production in the control of blast and sheath blight of rice. *Biological Control* 7: 185-195. 1996.
- Commare, R.J.; Nandakumar, R.; Kandam, A.; Suresh, S.; Bharathi, M.; Raguchander, T. & Samiyappan, R. *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leafhopper insect in rice. *Crop Protection* 21: 671-677. 2002.
- Farias, C.R.J. Espécies de *Bipolaris* associadas à helmintosporiose do arroz (*Oryza sativa* L.) no sul do Brasil. Tese de Doutorado. Pelotas RS. Universidade Federal de Pelotas. 2007.
- IRGA. Disponível em: <http://www.irga.rs.gov.br/arquivos/20080327154740.pdf>. Acesso em: abr. 2009.
- Krishnamurthy, K. & Gnanamanickam, S.S. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: evaluation of a marker gene and formulations. *Biological Control* 13: 158-165. 1998.
- Ludwig, J.; Moura, A.B.; Santos, A.S.; Lima, N. & Farias, D.R. Biocontrole de mancha-parda e da escaudadura do arroz, em casa-de-vegetação, pela microbiolização de sementes. Anais, 8<sup>o</sup> Simpósio Brasileiro de Patologia de Sementes, João Pessoa, PB. 2004. p.184.
- Ludwig, J.; Moura, A.B.; Schafer, J.T. & Correa, B.O. Biocontrole e transmissão de *Gerlachia* spp. e *Bipolaris* spp. de sementes para plântulas de arroz. In: Anais, 9<sup>o</sup> Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, RS. 2005. (CD-ROOM).
- Ludwig, J.; Moura, A. B.; Correa, B.O. & Torchelsen, G. M. Biocaracterização de isolados biocontroladores de doenças do arroz. *Fitopatologia Brasileira* 31: 285-286. 2006. (Resumo).
- Ludwig, J.; Moura, A.B.; Bacarin, M.A.; Falqueto, A.R. & Correa, B.O. Atividade de peroxidase em plantas de arroz tratadas com biocontroladores e inoculadas com *Bipolaris oryzae* ou *Gerlachia oryzae*. *Fitopatologia Brasileira* 32: 123-124. 2007a (Resumo).
- Ludwig, J.; Moura, A.B.; Bosembecker, V.K.; Somavilla, L.; Lima, D.L. & Gomes, C.B. Antagonistic potential of bacterial isolates for *Meloidogyne graminicola* control in flooded rice. Anales, 39<sup>a</sup> Reunión Anual de la Organización de Nematólogos de los Trópicos Americanos (ONTA), Córdoba. 2007b. p. 82.
- Ludwig, J.; Moura, A.B.; Nunes, C.D.; Correa, B.O. & Valerio, M.G.B. Espectro de ação de diferentes isolados biocontroladores frente a diferentes estirpes de *Bipolaris oryzae* e cultivares de arroz irrigado. Anais, 9<sup>a</sup>. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, Campinas, SP. 2007c.
- Ludwig, J.; Moura, A.B.; Santos, A.S. & Correa, B.O. Potencial de isolados bacterianos no biocontrole de doenças na cultura do arroz irrigado. Anais, 9<sup>a</sup>. Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, Campinas, SP. 2007d.

- Ludwig, J.; Moura, A.B.; Gomes, C.B. & Somavilla, L. Efeito de bactérias selecionadas para o controle de *Bipolaris oryzae* sobre a eclosão e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne graminicola*. Tropical Plant Pathology 33: 149. 2008. (Resumo).
- Moura, A.B.; Pierobom, C.R.; Nava, D.E. & Afonso, A.P. Tratamento de sementes de arroz para seleção massal de procariontes potenciais antagonistas a *Bipolaris oryzae*. Fitopatologia Brasileira 23: 213. 1998 (Resumo).
- Nandakumar, R.; Babu, S.; Viswanathan, R.; Raguchander, T. & Samiyappan, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biology and Biochemistry 33: 603-612. 2001.
- Ou, S.H. Rice Disease. 2<sup>nd</sup>. Ed. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 1985.
- Padgham, J.L. & Sikora, R.A. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. Crop Protection 26: 971-977. 2007
- Park, J.O.; El-Tarabily, K.A.; Ghisalberti, E.L. & Sivasithamparam, K. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. Letters in Applied Microbiology 35: 361-365. 2002.
- Prabhu, A.S. & Bedendo, I.P. Avaliação de germoplasma de arroz para resistência a *Gerlachia oryzae*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 25: 1093-1100. 1990.
- Prabhu, A.S.; Filippi, M.C. & Ribeiro, A.S. Doenças e seu controle. In: Vieira, N.R.; Santos, A.B. dos & Sant'ana, E.P. A cultura do arroz no Brasil. Santo Antônio de Goiás. Embrapa Arroz e Feijão. 1999. pp. 262-307.
- Rabindran, R. & Vidhyasekaran, P. Development of a formulation of *Pseudomonas fluorescens* PfALR2 for management of rice sheath blight. Crop Protection 15: 715-721. 1996.
- Santos, A.S.; Moura, A.B. & Silveira, A.O. Promoção de crescimento de plantas de arroz induzida por bactérias pré-selecionadas para o biocontrole da mancha-parda. Fitopatologia Brasileira 26: 300. 2001 (Resumo).
- Schafer, J.T.; Moura, A.B. & Ludwig, J. Rizobactérias biocontroladoras de doenças de arroz: dados adicionais de colonização radicular em diferentes cultivares. Anais, 14<sup>o</sup> Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, RS. 2005 (CD-ROOM).
- Schafer, J.T.; Gonçalves, V.P.; Moura, A.B. & Soares, V.N. Prospecção por isolados bacterianos produtores de antibióticos ativos contra fungos causadores de doenças caulinares e radiculares em plantas de arroz. Anais, 4<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, Pelotas, RS. 2007. pp. 731-733.
- Silveira, A.O.; Santos, A.S.; Pierobom, C.R. & Moura, A.B. Efeito de rizobactérias promotoras de crescimento (RBPC) em plantas de arroz. Anais, 10<sup>o</sup> Congresso de Iniciação Científica, Pelotas, RS. 2001. pp. 460-460.
- Soares, V.N. & Moura, A.B.. Prospecção por bactérias produtoras de antibióticos ativos contra fungos causadores de manchas foliares em arroz: Anais, 4<sup>o</sup> Congresso Brasileiro de Arroz Irrigado, Pelotas, RS. 2007. pp. 672-674.
- Steiner, U. & Schönbeck, F. Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschidt, R. Induced Resistance to Disease in Plants – Development in Plant Pathology, v.4. Dordrech. Kluwer Academic Pub. 1995.
- Vidhyasekaran, P.; Rabindran, R.; Muthamilan, M.; Nayar, K.; Rajappan, K.; Subramanian, N. & Vasumathi, K. Development of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* for control of rice blast. Plant Pathology 46: 291-297. 1997.
- Webster, R.K. & Grunell, P.S. Compendium of Rice Disease. St. Paul. APS Press. 1992.
- Wiwattanapatapee, R.; Pengoo, A.; Kanjanamaneesathian M.; Matchavanich, W.; Nilratana, L. & Jantharangsri, A. Floating pellets containing bacterial antagonist for control sheath blight of rice: formulations, viability and bacterial release studies. Journal of Controlled Release 95: 455-462. 2004.
- Wiwattanapatapee, R.; Chumthong, A.; Pengoo, A. & Kanjanamaneesathian M. Effervescent fast disinterig bacterial formulation for biological control of rice sheath blight. Journal of Controlled Release 119: 229-235. 2007.
- Zanatta, Z.G.C.N.; Schafer, J.T.; Moura, A.B.; Ludwig, J. & Santos, A.S. Colonização do sistema radicular de sementes de arroz por rizobactérias biocontroladoras e promotoras de crescimento. Fitopatologia Brasileira 29:175. 2004 (Resumo)

## Capítulo 22

# **Integração de Métodos Físicos e Biológicos para o Controle de Doenças e Pragas em Lírio e Espatifilo**

Johannes Petrus W. de Wit<sup>1</sup>; Ronaldo Aluisio Kievitsbosh<sup>2</sup>  
& Wagner Bettiol<sup>3\*</sup>

*<sup>1</sup>Jan de Wit Lírios, 13825-000 Holambra, SP, Brasil, e-mail: jandewit@uol.com.br;*

*<sup>2</sup>Viva Flora e Viva Flora Frutas, 13825-000, Holambra, SP, Brasil, e-mail: ronaldk@holnet.com.br;*

*<sup>3</sup>Embrapa Meio Ambiente, CP 69, 13820-000 Jaguariúna, SP, Brasil,  
e-mail: bettiol@cpnma.embrapa.br. \*Bolsista do CNPq.*

## **Introdução**

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de doenças, pragas e plantas invasoras na agricultura tem, reconhecidamente, promovido diversos problemas de ordem ambiental, como a contaminação dos alimentos, do solo, da água e dos animais; a intoxicação de agricultores; a resistência de patógenos, de pragas e de plantas invasoras a certos agrotóxicos; o surgimento de doenças iatrogênicas (as que ocorrem devido ao uso de agrotóxicos); o desequilíbrio biológico, alterando a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade. Além disso, as interações biológicas são prejudicadas pela interferência dos produtos. Por outro lado, a proteção de plantas por meio do uso de agrotóxicos apresenta características bastante atraentes, como a simplicidade, a previsibilidade e a necessidade de pouco entendimento dos processos básicos do agroecossistema para a sua aplicação. Por exemplo, para se obter sucesso com a aplicação de um fungicida de amplo espectro é importante o conhecimento de como aplicar o produto, sendo necessária pouca informação sobre a ecologia e a fisiologia de espécies, interações biológicas, ecologia de sistemas e ciclagem de nutrientes entre outras. Essa simplificação interessa basicamente à comercialização de insumos que interferem em muitas espécies e, conseqüentemente, desequilibram o sistema.

Um aspecto preocupante é o aumento da quantidade de ingrediente ativo dos agrotóxicos utilizada por unidade de área (Campanhola & Bettiol, 2003). Apesar da evolução desses produtos nas últimas décadas, em termos de quantidade de ingrediente ativo recomendado por área, ocorreu aumento do uso em praticamente todas as culturas, principalmente nas produzidas de forma intensiva.

Entretanto, ainda são poucos os produtos biocompatíveis à disposição dos agricultores. Ao mesmo tempo, há uma demanda da sociedade por alimentos e produtos agrícolas sem resíduos de agrotóxicos e uma grande preocupação com a preservação ambiental. Assim, mercados de produtos agrícolas produzidos sem o uso de agrotóxicos ou aqueles com selos que garantem que foram utilizados adequadamente estão em franco crescimento. Associado a isso, a sociedade se defronta com grandes problemas ambientais, sociais e econômicos causados pelas mudanças climáticas globais. Esses aspectos fazem com que a situação do uso dos agrotóxicos seja amplamente discutida e com isso ocupe espaço crescente na mídia nacional e internacional.

Essas pressões e a preocupação de grupos de agricultores têm levado ao desenvolvimento de sistemas de cultivo mais sustentáveis e, portanto, menos dependentes do uso de agrotóxicos. O conceito de agricultura sustentável envolve o manejo adequado dos recursos naturais, evitando a degradação do ambiente de forma a permitir a satisfação das necessidades humanas das gerações atuais e futuras. Esse enfoque altera as prioridades dos sistemas convencionais de agricultura em relação ao uso de fontes não renováveis, principalmente de energia e muda a visão sobre os níveis adequados do balanço entre a produção e os impactos no ambiente. As alterações implicam na redução da dependência por produtos químicos e outros insumos energéticos e o maior uso de processos biológicos nos sistemas agrícolas. Os sistemas mais sustentáveis buscam obter vantagens das interações de ocorrência natural. Os sistemas sustentáveis dão ênfase ao manejo das relações biológicas, como aquelas entre pragas e predadores, patógenos e antagonistas e em processos naturais, como a fixação biológica do nitrogênio e a solubilização de fósforo, ao invés do uso de métodos químicos. O objetivo é aumentar e sustentar as interações biológicas nas quais a produção agrícola está baseada, ao invés de reduzir e simplificar essas interações.

Um dos principais problemas da sustentabilidade agrícola refere-se ao controle de doenças, pragas e plantas invasoras. Diversas técnicas utilizadas para minimizar os danos ocasionados por esses problemas fitossanitários contaminam o ambiente ou causam alterações que comprometem a sustentabilidade do agroecossistema. Para reverter essa situação, as complexas interações biológicas são fundamentais para o sucesso do controle, devendo ser analisadas de modo holístico e consideradas a longo, e não em curto prazo. Assim sendo, há a necessidade de um amplo conhecimento da ecologia de sistemas (Atkinson & McKinlay, 1995). O resgate dos princípios e mecanismos que operam nos sistemas da natureza pode auxiliar na obtenção de sistemas agrícolas mais sustentáveis (Colégio, 1996; Reijntjes *et al.*, 1992; Gliessman, 2005).

Entretanto, nem sempre o uso de técnicas biocompatíveis isoladamente é suficiente para a obtenção de um controle adequado, mas é fundamental para o manejo integrado de pragas e doenças. Dentre as técnicas que estão sendo

disponibilizadas para os agricultores, o controle biológico vem ganhando espaço. A sua integração com outras medidas de manejo é bastante discutida, especialmente no contexto do manejo ecológico de doenças de plantas. Esse manejo é conceituado como um “conjunto de estratégias e de práticas empregadas com base nos princípios de controle de doenças de plantas, com o objetivo de reduzir as perdas em níveis toleráveis, sem interferir, acentuadamente, no ambiente” (Mizubuti & Maffia, 2001). Enfatiza-se o emprego integrado de táticas e métodos sejam eles culturais, mecânicos, físicos, legislativos, biológicos, de resistência genética, entre outros, com vista à prevenção e à redução da intensidade das doenças. A associação do controle biológico com outras estratégias de controle é altamente desejável.

A integração de métodos de manejo para mais de um patógeno ou pragas ao mesmo tempo aumenta as chances de sucesso de controle e contribui para a redução de custos. A integração de métodos fitossanitários é a principal forma de reduzir o uso de agrotóxicos em sistemas de produção, como tem se buscado no manejo integrado de pragas e na produção integrada de várias culturas. Entretanto, o seu sucesso só será possível após o conhecimento das possíveis interações entre plantas, fitófagos e patógenos e seus efeitos sobre a eficiência dos métodos considerados (Morandi & Bettiol, 2008).

## **Integração de Métodos Físicos e Biológicos para o Controle de Doenças e Pragas em Lírio**

A integração foi desenvolvida em uma propriedade especializada no cultivo de lírio, localizada em Holambra, SP, com histórico de utilização intensiva de fungicidas, inseticidas e acaricidas. Os problemas fitossanitários no lírio, cultura de alto valor agregado, são limitantes para o seu cultivo. Dentre esses se destacam as doenças causadas por *Botrytis elliptica*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotinia*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Pythium* e as pragas como pulgões, “fungus gnatus”, bicho mineiro, tripses e lagartas. Além disso, lesmas, caramujos, camundongos e pássaros são problemas importantes. Para resolver esses problemas lançava-se mão de mais de 30 marcas comerciais de agrotóxicos, com um custo de R\$10,00/m<sup>2</sup>/ano, em uma área cultivada de 13.500 m<sup>2</sup>. Entretanto, para que os produtos funcionassem adequadamente precisava-se utilizar doses cada vez mais altas, produtos cada vez mais tóxicos (faixa vermelha e amarela) e as perdas por pragas e doenças eram crescentes. Aliado a isso, os produtos não tinham registro para lírios. Finalmente, chegou-se à necessidade de se utilizar brometo metila para manter em funcionamento o sistema.

A partir desse ponto foi tomada a decisão de alterar o sistema de cultivo. A primeira medida foi deixar de utilizar agrotóxicos de faixa vermelha, sendo que essa fase demorou aproximadamente um ano. Mais um ano foi gasto para substituir os de faixa amarela. Finalmente, em mais um ano deixou-se de utilizar agrotóxicos na propriedade. Paralelamente à substituição dos agrotóxicos foi também alterada a fertilização da cultura para permitir a sobrevivência dos agentes de biocontrole.

Para se obter um controle integrado dos problemas, o uso dos agrotóxicos foi paulatinamente eliminado do sistema produtivo por meio da integração de métodos biocompatíveis para o controle de pragas e doenças, introduzindo uma diversidade de microrganismos. De um modo geral, a produção atual baseia-se na colonização de um substrato desinfestado com vapor, com *Trichoderma*, *Metarhizium*, *Beauveria* e microrganismos presentes em biofertilizante produzido aerobicamente, visando à eliminação do vácuo biológico promovido pela desinfestação. Além disso, são realizadas pulverizações com *Trichoderma*, *Clonostachys*, *Metarhizium*, *Beauveria* e *Bacillus thuringiensis israelensis*. Quando necessário, utiliza-se óleo de nin, própolis, fosfito e piro-alho, entre outros. Associado a esses produtos e a uma fertilização equilibrada, controlada diariamente, um programa de sanitização, com a eliminação de plantas e partes de plantas doentes, é mantido em todas as estufas. Além disso, faz-se uso de armadilhas e se controla a umidade relativa do ar dentro das casas-de-vegetação. Todas as caixarias, vasos e demais utensílios utilizados em cada ciclo produtivo (30 a 90 dias, dependendo das variedades cultivadas) são desinfestados com substância à base de pinho. Atualmente nenhum agrotóxico é utilizado, exceção para as flores destinadas ao mercado externo, cujos bulbos são tratados com Confidor® antes do plantio para o controle de pulgões, devido às barreiras fitossanitárias.

O sucesso se deve não apenas à substituição dos agrotóxicos por algum produto biocompatível, mas sim pela alteração de todo o sistema de produção, pois a simples substituição de produtos pode levar aos mesmos desequilíbrios causados pelos agrotóxicos. A área cultivada hoje é de 27.500 m<sup>2</sup> com custo aproximado para controle dos problemas fitossanitários em R\$3,00/m<sup>2</sup>/ano. Entretanto, o sistema ainda apresenta diversos problemas, sendo os principais relacionados com a qualidade dos produtos biológicos, registro desses produtos, fornecedores qualificados, controle de qualidade e, principalmente, poucos agricultores com sistemas integrados para troca de informações.

## **Integração de Métodos Físicos e Biológicos para o Controle de Doenças e Pragas em Espatifilo**

Um sistema semelhante ao descrito foi adotado na cultura de *Spathiphyllum* (espatifilo, bandeira-branca, lírio da paz) que tem como principal doença a causada por *Cylindrocladium spathiphylli*, além de *Pythium*, *Phytophthora* e “fungus gnatus”. A podridão de raiz e colo causada por *Cylindrocladium* é limitante para a cultura e os fungicidas disponíveis no mercado não são registrados para uso e não apresentam a eficiência desejada, devido aos problemas com a resistência do patógeno. Nesse exemplo é importante considerar ainda o ciclo da cultura que é de 18 meses, portanto, exposta por longo período aos problemas fitossanitários. Assim, considerando esses fatos, foi decidido substituir os agrotóxicos por técnicas alternativas de controle. Nas estufas de produção foi estabelecido um programa de substituição de fungicidas por técnicas que não causem estresses às plantas. Inicialmente o substrato de crescimento desinfestado é enriquecido com biofertilizante produzido aerobicamente

e com *Trichoderma*. Além disso, as plantas são pulverizadas semanalmente com agentes de biocontrole (*Trichoderma* spp., *Metarhizium anisopliae*, *Clonostachys rosea*, *Beauveria* sp., *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* e *Bacillus subtilis*) e extrato de peixe. Associado a isso foi montada uma estrutura na casa de vegetação para que os vasos permaneçam elevados em torno de 30 cm, com a finalidade de evitar a sua contaminação via solo. Também a sanitização é rotina nas casas-de-vegetação e o uso de armadilhas é constante. Um problema da cultura era a ocorrência de ratos logo após o transplante que arrancavam as mudas do substrato. Nesse caso o uso de raticidas foi substituído integralmente pela liberação de um gato nas estufas, sendo que o gato tem todo o acompanhamento veterinário recomendado.

## Considerações Finais

Há necessidade de se considerar que nenhum sistema de produção pode prescindir de um adequado retorno econômico para a manutenção da atividade. Assim, além dos aspectos ambientais, sociais e de produção, os econômicos são fundamentais. Esses modelos de produção relatados, que aparentemente funcionam apenas para casos especiais, podem ser explorados para todas as culturas, havendo necessidade de adaptação para cada situação. É fundamental que cada propriedade desenvolva o seu modelo, pois para cada região, clima e solo, as necessidades são diferentes.

O conceito absoluto de agricultura sustentável pode ser impossível de ser obtido na prática. Entretanto, é função da pesquisa e da extensão oferecer opções para que sistemas mais sustentáveis sejam adotados. As discussões demonstram a necessidade da interdisciplinaridade dos projetos de pesquisa, pois somente estudos que incluam o monitoramento de sistemas de produção nas diversas áreas do conhecimento fornecerão informações suficientes para o entendimento das diferentes interações.

## Referências

- Atkinson, D. & Mckinlay, R.G. Crop protection in sustainable farming systems. In: Mckinlay, R.G. & Atkinson, D. Integrated crop protection: towards sustainability. Farnham. British Crop Protection Council. 1995. pp. 483-488. (BCPC Symposium Proceedings, 63).
- Campanhola, C. & Bettiol, W. Métodos Alternativos de Controle Fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003.
- Colégio Oficial de Ingenieros Agronomos de Centro y Canarias. Manual de Prácticas y Actuaciones Agroambientales. Madrid. Editorial Agrícola Española/Ediciones Mundi-Prensa. 1996.
- Gliessman, S.R. Agroecología: procesos ecológicos em agricultura sustentável. Porto Alegre, RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.
- Mizubuti, E.S.G. & Maffia, L.A. Aplicações de princípios de controle o manejo ecológico de doenças de plantas. Informe Agropecuário 22: 9-18. 2001.
- Morandi, M.A.B. & Bettiol, W. Integração de métodos biocompatíveis no manejo de doenças e pragas: experiências em plantas ornamentais e medicinais. Tropical Plant Pathology 33: 31-34. 2008.
- Reijntjes, C.; Haverkort, B. & Waters-Bayer, A. Farming for the Future: an introduction to low-external-input and sustainable agriculture. Leusden. Ilea. 1992.



## Capítulo 23

# **Integração de Métodos Físicos e Biológicos no Controle de Doenças em Viveiros de Plantas Medicinais: Estudo de Caso com *Cordia verbenacea***

Marcelo Augusto Boechat Morandi

*Embrapa Meio Ambiente, CP 69, 13820-000, Jaguariúna, SP, Brasil, e-mail:  
mmorandi@cnpma.embrapa.br*

## **Introdução**

A procura por medicamentos fitoterápicos vem crescendo nos últimos anos em todo o mundo, aliada ao consumo de alimentos orgânicos e à perspectiva de uma vida mais saudável (Luz, 2005). O interesse das empresas farmacêuticas por estes produtos tem gerado um significativo aumento nas pesquisas com plantas medicinais (Ribeiro, 2001). Também aumenta o número de programas de saúde pública e de ações sociais que incentivam o uso e a produção das plantas medicinais visando terapias mais adequadas a certos contextos e como alternativa agrícola para populações locais (Magalhães, 2004).

Um dos desafios para o desenvolvimento dos fitoterápicos é o cultivo das plantas em larga escala, porém, de modo sustentável, sem comprometimento dos recursos naturais e preservando o ambiente (Vaz *et al.*, 2006). Neste contexto, a produção de plantas medicinais representa uma alternativa inovadora e interessante para o agronegócio brasileiro (Lourenzani *et al.*, 2004). Entretanto, com a domesticação e melhoramento destas plantas, visando à seleção de genótipos interessantes quanto aos seus aspectos agronômicos e à composição química relacionada com sua atividade, torna-se quase inevitável o convívio com a ocorrência de pragas e doenças. Este capítulo aborda um estudo de caso de integração de medidas para o manejo de uma doença limitante à multiplicação em viveiro de mudas de erva-baleeira (*Cordia verbenacea* Al. DC).

## A Erva Baleeira

A erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) é uma das espécies de plantas exploradas visando a produção de óleo essencial, utilizado na fabricação de fitoterápicos com atividade antiinflamatória (Fernandes *et al.*, 2007; Carvalho Jr. *et al.*, 2004). O gênero *Cordia* pertence à família Boraginaceae, que abrange cerca de 250 espécies, sendo que a maioria possui porte arbóreo ou arbustivo. A espécie *Cordia verbenacea* é nativa das Américas, sendo encontrada desde a América Central até a Região Central da Argentina (Barroso *et al.*, 2002). A erva-baleeira pode ser encontrada nas restingas marítimas de quase todo o litoral brasileiro, mas é mais comum no trecho compreendido entre os estados de Santa Catarina e São Paulo, na região da Mata Atlântica. Também é encontrada em regiões baixas da Amazônia.

A planta é muito ramosa, possui arquitetura esgallhada e caótica e hastes revestidas por casca fibrosa. Suas folhas são aromáticas e possuem margens dentadas de coloração verde escura, com tamanho variando entre 10 e 15 cm, e as flores são pequenas, brancas e reunidas em espigas laterais e frutos pequenos, arredondados e de cor vermelho escuro (Ferri *et al.*, 1981). A espécie pode alcançar até três metros de altura. Entretanto, no sistema agrícola em uso no Brasil, as plantas atingem por volta de um metro (Lorenzi, 2003).

A propagação de mudas de *Cordia verbenacea* é feita em viveiros (Figura 1). As mudas podem ser obtidas a partir de sementes ou do enraizamento de estacas de ramos novos. Uma lavoura instalada de *Cordia verbenacea* fornece, após três anos, 16.000 kg/ha/ano de biomassa, o que é suficiente para a produção de 10 kg de óleo essencial. Com a seleção de melhores genótipos e melhoria das técnicas de cultivo pode-se chegar a 25 kg/ha/ano do óleo.

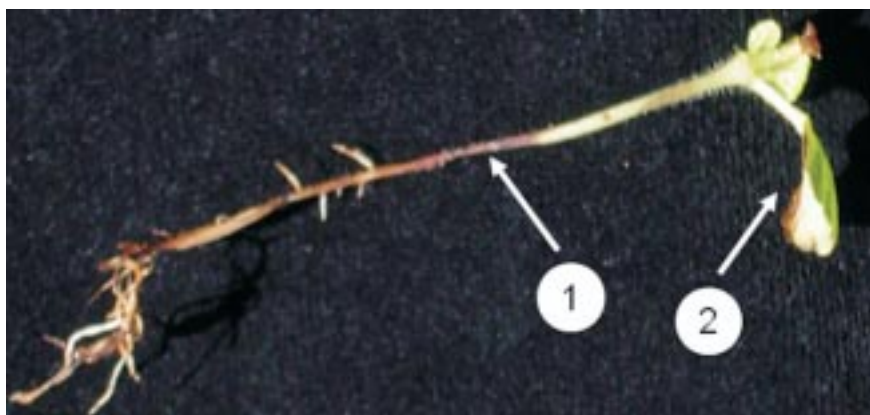


**Figura 1.** Viveiro de mudas de *Cordia verbenacea* do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).

O monocultivo em áreas extensas, em função da necessidade de se obter grandes quantidades de folhas de *Cordia verbenacea* e para suprir a indústria, tem provocado a ocorrência de pragas e doenças ainda desconhecidas na cultura. Recentemente, por exemplo, Rosa *et al.* (2008) observaram plantas de erva-baleeira atacadas pelo percevejo *Dictyla monotropidia*, que sugam a seiva do floema e causam encarquilhamento, seguido de amarelecimento e queda de folhas. Segundo os autores, *Dictyla monotropidia* foi relatada como praga de outras espécies de *Cordia* em países das Américas Central e do Sul. Entretanto, este é o primeiro relato do inseto atacando plantas de *Cordia verbenacea* no Brasil.

## Ocorrência e Manejo da Podridão de *Phoma* em Viveiro

Em 2004 foi identificado no viveiro do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) uma doença causada por *Phoma* sp. (Morandi, 2008). Os sintomas da doença são necrose das nervuras e estrangulamento das hastes, com formação de inúmeros picinídios (Figura 2). As perdas chegaram a mais de 60% das mudas no viveiro e em um primeiro teste verificou que o patógeno não estava sendo transmitido pelas sementes. Porém, os novos lotes de mudas eram rapidamente infectados ao serem colocados no viveiro.



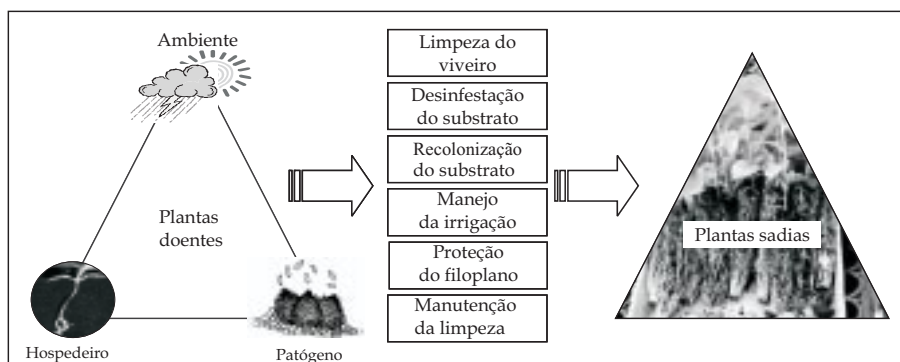
**Figura 2.** Sintomas de estrangulamento das hastes (1) e necrose das nervuras (2) causados por *Phoma* sp. em mudas de *Cordia verbenacea*.

Com base em princípios epidemiológicos e no manejo integrado, foi proposto um esquema que incluiu, em sequência, medidas que visam à redução do inoculo inicial, à proteção das plantas contra a infecção e à limitação da disseminação do patógeno no viveiro (Figura 3).

**Medidas que visam à redução do inóculo inicial do patógeno na área:** a) Limpeza e desinfestação das instalações do viveiro. Para tal foram removidas todas as plantas e restos culturais e realizada a lavagem das bancadas e piso, seguida da desinfestação das instalações com hipoclorito de sódio; e b) Desinfestação prévia do substrato com coletor solar (Ghini & Bettiol, 1991; Bettiol & Ghini, 2003).

**Medidas que visam ao incremento da atividade microbiana (controle biológico natural) e a proteção das plantas:** a) Recolonização do substrato com aplicação de biofertilizante a base de esterco bovino, visando ao incremento da diversidade e atividade microbianas no substrato (Bettiol *et al.*, 2005); b) Proteção do filoplano, por meio da pulverização quinzenal de biofertilizante a 10%, visando à formação de uma “barreira biológica” sobre as mudas.

**Medidas que visam limitar a ocorrência de ambiente favorável à infecção e à disseminação de inóculo no viveiro:** a) Manejo da irrigação, com a redução da frequência e ajuste da hora, para reduzir o período de molhamento foliar e assim limitar a ocorrência de ambiente favorável à infecção; b) Manutenção da limpeza, por meio da eliminação frequente de plantas e partes de plantas doentes, visando à redução da disseminação do inóculo secundário do patógeno no interior do viveiro.



**Figura 3.** Integração de métodos físicos e biológicos para o manejo de *Phoma* sp. em mudas de *Cordia verbenacea*.

## Considerações Finais

A integração desses métodos físicos e biológicos mostrou-se eficiente no controle de perdas causadas pelo patógeno no viveiro. Verificou-se, após a implementação destas medidas, uma redução drástica das perdas causadas pela doença, de 60%, em média, para menos de 10% das mudas. Assim, a integração de medidas simples, baseadas no conhecimento epidemiológico, podem ser ferramentas valiosas no manejo de doenças em viveiros e podem contribuir para o cultivo sustentável de plantas medicinais.

## Referências

- Barroso, I.C.E.; Oliveira, F.; Branco, L.H.Z.; Kato, E.T.M. & Dias, T.G. O gênero *Cordia* L.: Botânica, química e farmacologia. Revista Lecta 20: 15-34. 2002.
- Bettiol, W. & Ghini, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: Campanhola, C. & Bettiol, W. Métodos alternativos de controle fitossanitário. Jaguariúna. Embrapa Meio Ambiente. 2003. pp. 80-96.
- Bettiol, W.; Ghini, R. & Morandi, M.A.B. Alguns métodos alternativos para o controle de doenças de plantas disponíveis no Brasil. In: Venzon, M.; Paula Júnior, T.J. & Pallini, A. Controle alternativo de pragas e doenças. Viçosa. EPAMIG/CTZM:UFV. 2005. pp. 163-183.
- Carvalho Jr., D.C.P.M.; Rodrigues, R.F.O.; Sawaya, A.C.H.F.; Marques, M.O.M. & Shimizu, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea*. Journal of Ethnopharmacology 95: 297-301. 2004.
- Fernandes, E.S.; Passos, G.F.; Medeiros, R.; Cunha, F.M.; Ferreira, J.; Campos, M.M.; Pianowski, L.F. & Calixto, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. European Journal of Pharmacology 569: 228-236. 2007.
- Ferri, M.G.; Menezes, N.L. & Monteiro-Scanavacca, W.R. Glossário Ilustrado de Botânica. 1ed. São Paulo. Nobel. 1981.
- Ghini, R. & Bettiol, W. Coletor solar para desinfestação de substratos. Summa Phytopathologica 17: 281-286. 1991.
- Lourenzani, A.E.B.S.; Lourenzani, W.L. & Batalha, M.O. Barreiras e oportunidades na comercialização de plantas medicinais provenientes da agricultura familiar. Informações Econômicas 34: 15-25. 2004.
- Lorenzi, H.; Souza, H.M., Torres, M.A. & Bacher, V.L.B. Árvores Exóticas no Brasil: Madeiras, ornamentais e aromáticas. Nova Odessa. Plantarum. 2003.
- Luz, M.T. Contemporary culture and complementary medicine: New paradigm in health in the end of the century. Physis 15: 145-176. 2005.
- Magalhães, P.M. University of Campinas, Brazil: an interesting model of interaction with MAP producers. Newsletter of the International Council for Medicinal and Aromatic Plants 10: 24-27. 2004.
- Morandi, M.A.B. Integração de métodos físicos e biológicos de doenças em viveiros de plantas medicinais: estudo de caso com *Cordia verbenacea*. Summa Phytopathologica 34: 179. 2008. (Resumo).
- Ribeiro, M.A.R. Public health and chemical-pharmaceutical companies. História Ciência Saúde, Manguinhos 7: 607-626. 2001.
- Rosa, D.D.; Basseto, M.A.; Feliciano, F.; Neves, M.B. & Baldin, E.L.L. Ocorrência de *Dictyla monotropidia* Stal (Hemiptera: Tingidae) em *Cordia verbenacea* Al. DC no Brasil. Neotropical Entomology 37: 236-238. 2008.
- Vaz, A.P.A.; Scaranari, C.; Batista, L.A.R.; Figueira, G.M.; Sartoratto, A. & Magalhães, P.M. Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas. Pesquisa Agropecuária Brasileira 41: 869-872. 2006.



---

*Meio Ambiente*

Um dos objetivos da publicação é apresentar alternativas que colaborem na redução do uso de agrotóxicos por unidade de área, um dos grandes problemas da agricultura mundial. A primeira parte trata de aspectos gerais do controle biológico e a segunda relata casos de sucesso no uso de agentes de biocontrole e sua integração com outros métodos. A obra inclui capítulos sobre a história e a situação do controle biológico de doenças de plantas no Brasil, impactos das mudanças climáticas globais sobre o controle biológico, comercialização de agentes de biocontrole, utilização de resíduos orgânicos na indução de supressividade de solo, a situação das indústrias de controle biológico, a utilização de controle biológico para grandes culturas, bactérias como ferramentas para o manejo de doenças, integração de métodos biológicos para o controle de doenças em diversas culturas, controle biológico da vassoura-de-bruxa, indução de resistência em plantas por bactérias, controle biológico de plantas daninhas e potencial de óleos essenciais e de extratos vegetais para o controle de fitopatógenos.