

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**POTENCIAL DA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES COM
RIZOBACTÉRIAS PARA O CONTROLE DO MOFO BRANCO NO
FEIJÃO**

Daniela Pimentel Rodriguez

Pelotas, 2015

DANIELA PIMENTEL RODRIGUEZ

**POTENCIAL DA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES COM
RIZOBACTÉRIAS PARA O CONTROLE DO MOFO BRANCO NO
FEIJÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia).

Orientadora: Dr^a. Andrea Bittercourt Moura

Co-orientadora: Dr^a. Bianca Obes Corrêa

Pelotas, 2015

*Aos meus pais Paulo Daniel e Luci Mara, irmãos Luciana, Luiz Roberto, e eterno
namorado Mateus Peçanha.*

Dedico

Agradecimentos

Aos meus pais, Luci Mara e Paulo Daniel que se mostraram fiéis companheiros durante esta etapa, servindo como verdadeiros pilares para que eu chegasse até aqui. A vocês deixo meu muito obrigado, amo vocês.

Aos meus irmãos Luiz Roberto e Luciana e tio Nico que foram essenciais nos momentos difíceis, pela ajuda e descontração dada, meu muito obrigado.

Ao meu eterno namorado Mateus Peçanha pela compreensão, apoio, ajuda e companheirismo meu mais sincero agradecimento, te amo.

À minha orientadora Professora Dra. Andrea Bittencourt Moura, pela compreensão, longas conversas e ensinamentos adquiridos ao longo desses dois anos.

À minha coorientadora Professora Dra. Bianca Obes Corrêa pela colaboração, amizade, incentivo, motivação e ensinamentos durante a realização da dissertação.

Ao Professor Dr. Marcos Baccarin por disponibilizar a casa de vegetação para a realização dos experimentos.

Aos professores da Pós-graduação em Fitopatologia, Dra. Cândida Jacobsen, Dr. Danielle Barros, Dr. Leandro Dallagnol e Dr. Cesar Bauer Gomes que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Ao Professor Dr. Trazilbo José de Paula Júnior e seu doutorando Renan Lima pelo auxílio e colaboração neste trabalho.

À minha amiga e pesquisadora Dra. Glaucia de Figueiredo Nachtigal, pela colaboração, apoio, e conselhos estes sempre dados na hora e momento certo.

Aos colegas do laboratório de Bacteriologia Vegetal, Renata, Johan, Mauricio e Marcelo pela amizade, companheirismo e apoio no desenvolvimento dos experimentos.

Aos colegas da Universidade: Aline, Priscila, Elen, Silvia, Carla, Jaqueline, Vitor, Cristiano, Viviana, Fábio Jr., Keilor e Paulo, por todo o apoio nos momentos difíceis e de descontração nos corredores e no RU.

Aos laboratoristas Sérgio Freitas e Rosária Helena Azambuja, sempre dispostos a ajudar, e colaborar e sobretudo solucionar os problemas.

À Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – UFPel, Departamento de Fitossanidade e ao Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, pela oportunidade de aprendizado.

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

A banca examinadora pela disponibilidade e colaboração no trabalho

A todos que contribuíram mesmo que indiretamente para que este trabalho fosse desenvolvido e se tornasse realidade.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos no mínimo fará coisas admiráveis”.

José de Alencar

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Andrea Bittencourt Moura
(Orientadora)

Dr. Pesq. Embrapa César Bauer Gomes

Dr. Pesq. Embrapa Irajá Ferreira Antunes

Dr. Ismail Teodoro de Souza Júnior

Resumo

RODRIGUEZ, Daniela Pimentel. **POTENCIAL DA MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES COM RIZOBACTÉRIAS PARA BIOCONTROLE DO MOFO BRANCO NO FEIJÃO**. 2015.66f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) apresenta importância econômica no país, onde seu cultivo é amplamente distribuído. No entanto, a cultura pode apresentar queda na produtividade devido à incidência do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de isolados bacterianos previamente selecionados para o biocontrole de diferentes doenças do feijão no controle do mofo branco. Para tanto, sementes de feijão do cultivar BRsValente foram microbiolizadas com diferentes tratamentos bacterianos e seu efeito avaliado através de bioensaios com folhas destacadas de feijão, bem como ensaio “in planta”. Os experimentos foram conduzidos em laboratório e casa de vegetação. Foram utilizados oito isolados bacterianos DFs 93; DFs348; DFs 513; DFs 769; DFs 831; DFs 842; DFs 843 e DFs 912 avaliados de modo individual ou em combinações. Os isolados bacterianos indicaram potencial de controle para mofo branco, através da microbiolização de sementes de feijão. A utilização de combinação C03 e dos DFs831, DFs842, DFs912 resultou em controle eficiente em alguns aspectos avaliados, reduzindo a severidade do mofo branco. Pelas avaliações *in vitro*, verificou-se que os isolados bacterianos produzem enzimas hidrolíticas envolvidas no biocontrole, além de amônia e sideróforos, apontando para o potencial destes isolados atuarem por diferentes mecanismos de ação. Por fim, este trabalho explica pelo menos em parte, a habilidade biocontroladora e o potencial destes tratamentos bacterianos.

Palavras-chave: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phaseolus vulgaris* L., biocontrole

Abstract

RODRIGUEZ, Daniela Pimentel. **SEED MICROBIOLIZATION WITH RHIZOBACTERIA FOR WHITE MOLD BIOCONTROL IN BEAN.** 2015. 66f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

The bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is of economical relevance for the country where its cultivation is largely distributed. However, the cultivation might present a decrease in productivity due to the incidence of white mold caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Considering that, this study aimed at evaluating the potential of isolated bacteria previously selected for the biocontrol of different diseases of beans for white mold control. For that purpose, seeds cultivar BRsValente were microbiolized with distinct bacterial treatments and the effect of microbiolization was assessed through bioassays with detached leaves, as well as *in plant* assay. Trials were carried out in lab and greenhouse conditions. Eight bacterial isolates were used: DFs93; DFs348; DFs513; DFs769; DFs831; DFs842; DFs843 and DFs912, evaluated either individually or in combinations. Isolated bacterial showed potential control for the white mold through microbiolization of bean seeds. The use of combination C03 and of DFs831, DFs842 and DFs912 resulted in efficient control in some aspects evaluated by reducing the severity of white mold. *In vitro* evaluations showed that the bacterial isolates produce not only hydrolytic enzymes involved in the biocontrol, but also ammonia and siderophores, indicating for the potential of those isolates to act through different modes of action. Finally, this paper explains at least in part, the biocontrol ability and the potential of these bacterial treatments.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phaseolus vulgaris* L., biological control

Lista de Figuras

- Figura 1.** Dispersão gráfica de onze tratamentos bacterianos em relação às três variáveis canônicas (VC1, VC2 e VC3). Valores gerados a partir de dados de severidade do mofo branco em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas com bactérias, mantidas em casa de vegetação climatizada e cujos pecíolos das quartas folhas foram inoculados pela técnica desenvolvida por Petzoldt; Dickson (1996). Testemunha (1); DFs93- *Bacillus cereus* (2); DFs513 - *Pseudomonas veronii* (3); DFs769 - *Bacillus cereus* (4); DFs831- *Pseudomonas fluorescens* (5); DFs842 - *Pseudomonas fluorescens* (6); DFs843 - *Rhodococcus fasciens* (7); DFs912 - *Rhodococcus fasciens* (8); C01 (DFs093+DFs769+DFs831) (9); C02 (DFs093+DFs769+DFs842) (10); C03 (DFs348+DFs769+DFs831) (11)34

Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Identificação e habitat dos isolados bacterianos utilizados para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*.....22
- Tabela 2.** Efeito da microbiolização de sementes de feijão com tratamentos bacterianos no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir da inoculação em folhas destacadas, bioensaio I mantidas em câmara de incubação a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas.....28
- Tabela 3.** Efeito da microbiolização de sementes de feijão com tratamentos bacterianos no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir da inoculação em folhas destacadas, bioensaio II mantidas em câmara de incubação a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas.....29
- Tabela 4.** Efeitos da inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijão cultivar BRS Valente em casa de vegetação, anteriormente microbiolizadas com bactérias mensurados pelo número de dias após a inoculação em que as plantas permaneceram vivas (DV), percentagem de plantas vivas 14 dias após inoculação (%V), comprimento da lesão no ponto de inoculação (CL), número de dias onde ocorreu o maior tamanho de lesão (DML), severidade 8, 9, 10, 11, 12 e 13 dias após a inoculação respectivamente (S8, S9, S10, S11, S12 e S13), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), massa seca de plantas 14 dias após a inoculação (MS). Plantas conduzidas em casa de vegetação climatizada, inoculadas no pecíolo da quarta folha trifoliolada pela técnica desenvolvida por (Petzoldt; Dickson, 1996).....31
- Tabela 5.** Estimativa de variância associada às variáveis canônicas de biocontrole em plantas de feijão inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. Plantas conduzidas em casa de vegetação climatizada, inoculadas no pecíolo da quarta folha trifoliolada pela técnica desenvolvida por Petzoldt; Dickson (1996).....32

Tabela 6.	Tratamentos bacterianos agrupados pelo método de Tocher, considerando valores gerados a partir de dados de severidade do mofo branco em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas com bactérias, mantidas em casa de vegetação climatizada e cujos pecíolos das quartas folhas foram inoculados pela técnica desenvolvida por Petzoldt; Dickson (1996)	33
Tabela 7.	Identificação dos isolados utilizados e respectiva procedência de isolamento.....	42
Tabela 8.	Caracterização biológica de isolados biocontroladores de doenças do feijão em função da produção de compostos relacionados ao controle biológico de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. CAPÍTULO I - MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO PARA BIOCONTROLE DE <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
2.1 - Introdução	19
2.2 - Material e métodos	22
2.2.1 - Isolados utilizados e sua manutenção	22
2.2.2 - Preparo das suspensões bacterianas e microbiolização de sementes.....	23
2.2.3 - Plantio e condução do bioensaio	23
2.2.3.1 - Avaliação do biocontrole do mofo branco em folhas destacadas.....	23
2.2.3.2-Delineamento experimental e análises estatísticas.....	24
2.2.4 - Avaliação do biocontrole do mofo branco “ <i>in planta</i> ” em casa de vegetação.....	24
2.2.4.1 - Plantio e condução do bioensaio	24
2.2.4.2 - Obtenção do inóculo	25
2.2.4.3 - Inoculação das plantas de feijão	25
2.2.4.4 - Delineamento experimental e análises estatísticas	26
2.3 - Resultados	27
2.3.1 - Discussão	35
2.4 - Conclusões	39
3. CAPÍTULO II – CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS BIOCONTROLADORES DE DOENÇAS DO FEIJÃO	40
3.1 - Introdução	40
3.2 - Material e métodos	42
3.2.1 - Isolados utilizados	42

3.2.3 - Avaliação da produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas (CRBCPC)	43
3.2.3.1 - Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas	43
3.2.3.1 - Hidrólise de carboidratos	43
3.2.3.2 - Hidrólise de proteínas	44
3.2.3.3 - Hidrólise de lipídeos	45
3.2.3.4 - Produção de compostos antimicrobianos	45
3.3 - Resultados	47
3.3.1 - Discussão	50
3.4 - Conclusões	53
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado um dos principais produtos da alimentação brasileira, por ser fonte de proteínas, fibras, vitaminas, carboidratos e minerais essenciais para o organismo (MEDEROS et al., 2013). No Brasil é a principal leguminosa fornecedora de proteínas, por isso está presente diariamente na dieta dos brasileiros (SILVA et al., 2009 a). Na safra 2015, a área cultivada de feijão no Brasil foi de 3.197,1 mil ha, com produção de 3.338 mil toneladas. Os estados do Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Goiás são os principais responsáveis pela produção do grão. Tal cultivo, só tem sua produção superada pelas culturas da soja, do milho e do algodão, que apresentam área de cultivo e produção mais elevadas (CONAB, 2015). Um dos fatores responsáveis pelas consideráveis reduções da produtividade é a susceptibilidade da cultura a doenças que podem ser causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (VIEIRA, 1988; BOLAND; HALL, 1994). Dentre os patógenos habitantes do solo, os fungos *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum* são relatados como principais patógenos da cultura (BIANCHINI et al., 2005).

Dentre estes, o fungo *S. sclerotiorum*, é um patógeno cosmopolita e inespecífico, capaz de infectar mais de 400 espécies de plantas, incluindo importantes grupos como algodão, soja, canola, tomate e feijão (BOLAND; HALL, 1994; BOLTON et al., 2006). No feijão, causa a doença conhecida como mofo branco, que se destaca devido à sua incidência poder causar até 100% de perdas na produção (SCHWARTZ et al., 2012). O mofo branco, ocorre em um grande número de países, especialmente naqueles de clima temperado e subtropical (BIANCHINI et al., 2005), em condições de temperaturas moderadas (15-22°C) entre o outono e ou inverno (PAULA JÚNIOR et al., 2006), principalmente em áreas sob irrigação por pivô central (PAULA JÚNIOR et al., 2009).

Um dos fatores responsáveis por perdas significativas da produção na cultura do feijão, está relacionado à capacidade deste fungo formar estruturas de resistência, denominadas escleródios, as quais podem permanecer dormentes no solo por longos períodos, em condições adversas, desenvolvendo-se quando a cultura já está instalada, ou até que as condições ambientais favoráveis de temperatura e umidade estejam presentes para sua germinação (SCHWARTZ et al., 2012).

Assim, a germinação do escleródio, pode ocorrer pela forma miceliogênica, onde os escleródios formam hifas que se distribuem pelo solo e infectam os tecidos das plantas, e pela forma carpogênica, responsável por gerar apotécios, que liberam ascósporos que se disseminam pelo ar, servindo como inóculo primário para a infecção dos tecidos acima do solo e logo se distribuem por toda a planta (SUN; YANG, 2000; SCHWARTZ et al., 2012).

Dentre os principais sintomas observados, destacam-se manchas aquosas que se desenvolvem para podridão mole. Além disso os tecidos infectados ficam cobertos pelo crescimento micelial branco e cotonoso do patógeno. Quando a infecção ocorre na semente, as mesmas tornam-se opacas apresentando aparência de giz, mais leves que as sementes sadias (BIANCHINI et al., 2005).

Devido a estas particularidades, o controle da doença torna-se difícil. No entanto, a adoção de estratégias de manejo integrado possibilita o convívio com a doença, a partir da redução de inóculo presente na lavoura (STEADMAN, 1979; MUELLER et al., 2002). Dentro desta estratégia inserem-se o uso de sementes sadias, baixa densidade de semeadura, rotação de culturas, controle da irrigação, emprego de fungicidas e o uso de cultivares resistentes (PAULA JÚNIOR et al., 2012), apesar desta última medida não ser aplicada no Brasil, pois não há registro de cultivares de feijão resistentes à *S. sclerotiorum* (BARBOZA; GONZAGA, 2012).

O controle químico do mofo branco ainda consiste em uma das principais alternativas de manejo (BARDIN; HUANG, 2001), no entanto elevam os custos de produção, além de causar diversos danos ambientais e ao próprio homem. Adicionalmente, há o risco do desenvolvimento de populações resistentes aos grupos de fungicidas utilizados. Este aspecto foi observado por Li e Zhou (2004) em experimentos a campo, onde houve redução da eficácia de produtos do grupo

dos benzimidazóis no controle de *S. sclerotiorum*, devido ao surgimento de populações do patógeno menos sensíveis a esses produtos.

No Brasil, atualmente 410 produtos estão registrados como agrotóxicos para o controle de doenças e pragas na cultura do feijão, sendo apenas quatro compostos biológicos a base de *Trichoderma spp.* e *Bacillus thuringiensis*. Especialmente para *S. sclerotiorum* no feijão, há registro de um fungicida microbiológico que contém em sua formulação *Trichoderma asperellum* (AGROFIT, 2015).

A partir disso fica evidente o quanto é necessário o desenvolvimento de outras medidas de controle da doença. Neste sentido, buscam-se métodos eficientes e viáveis, que possam ser utilizados juntamente com outras medidas de controle no manejo integrado de doenças. Assim, o controle biológico, surge como uma estratégia interessante para o controle de *S. sclerotiorum*, pois além de possibilitar a redução do uso de agrotóxicos, estimula associações positivas a partir da inserção de microrganismos com potencial antagônico (WU et al., 2014).

De tal modo, pesquisas direcionadas ao controle de fitopatógenos a partir de agentes de biocontrole tem revelado uma gama de microrganismos, tais como bactérias (BARRA et al., 2008; LANNA FILHO et al., 2010), fungos (HUANG et al., 2000; MOHAMED; HAGGAG, 2006), e leveduras (ELAD et al., 1994), dispensados em diferentes espécies cultivadas. Dentre estes, as bactérias, destacam-se por atuarem por diferentes mecanismos de ação, tais como, parasitismo, antibiose, competição ou indução de resistência (ROMEIRO, 2007; KUMAR et al., 2012 a; JI et al., 2013). Os gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* são os mais estudados, devido à capacidade destas bactérias induzirem resistência, além de exercerem antagonismo direto, pela produção de compostos antimicrobianos (LATHA et al., 2011; WU et al., 2014).

Especialmente para *S. sclerotiorum*, agentes de controle biológico têm mostrado eficiência, por possibilitarem inibição do crescimento micelial e a não formação de escleródios, a partir de diferentes mecanismos de ação. Dentre estes os gêneros *Bacillus* (YUEN et al., 1991; REMUSKA; PRIA, 2007; WU et al., 2014) e *Pseudomonas* em ensaios *in vivo* têm demonstrado ser eficientes (BERRY et al., 2010; LOEWEN et al., 2014).

Neste contexto, estudos baseados no biocontrole vêm sendo desenvolvidos há mais de dez anos pelo grupo de pesquisa em bactérias

biocontroladoras e promotoras de crescimento vegetal da Universidade Federal de Pelotas, onde foram selecionadas bactérias para biocontrole de importantes doenças do feijão, como o crestamento bacteriano comum (ZANATTA et al., 2007), antracnose (CORRÊA et al., 2008) mancha angular, podridão cinzenta, murcha do curtobactério, murcha de fusário (CORRÊA et al., 2014) e nematoide das galhas (CORRÊA et al., 2012). Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar estas bactérias, individualmente e em combinações, a partir da microbiolização de sementes de feijão, para o controle do mofo branco, bem como determinar os potenciais mecanismos pelos quais ele se dá.

CAPÍTULO I

MICROBIOLIZAÇÃO DE SEMENTES DE FEIJÃO PARA BIOCONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*

2.1 - INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de feijão. Seu cultivo está distribuído em diferentes regiões do país, sendo os maiores produtores deste grão os estados do Paraná e Minas Gerais (MAPA, 2015). Consumido diariamente por grande parte da população brasileira, é fonte de importantes nutrientes essenciais, como proteínas, fibras, vitaminas e carboidratos (SILVA et al., 2009 a).

Embora consumo e cultivo de feijão no país sejam expressivos, a sua produtividade é baixa. Um dos principais fatores limitantes é a incidência de doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides, gerando perdas, e aumento dos custos de produção (VIEIRA, 1988).

Dentre as doenças fúngicas destaca-se o mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, patógeno habitante de solo, que infecta mais de 400 espécies vegetais (REIS et al., 2011). *Sclerotinia sclerotiorum* pode sobreviver no solo, sobre o solo ou em restos de cultivo, a partir de escleródios, que conferem resistência ao patógeno em condições ambientais adversas (BOLTON et al., 2006).

Os métodos de controle do mofo branco devem ser tomados em conjunto para se tornarem mais eficientes, deste modo a estratégia de controle não deve ser definida isoladamente (PAULA JUNIOR et al., 2006). As principais medidas utilizadas para o controle da doença, estão na rotação de culturas, na adição de

produtos biológicos, e na aplicação de fungicidas. Atualmente a aplicação de fungicidas, consiste na alternativa mais utilizada, no entanto é responsável por favorecer o surgimento de populações resistentes do patógeno (BARDIN; HUANG, 2001; MUELLER et al., 2002).

No que diz respeito ao controle biológico de fitopatógenos, de modo geral, as bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* conferem às plantas habilidade de ativar genes envolvidos na síntese de compostos associados à formação de barreiras físicas e ou de mecanismos químicos de defesa, a partir da produção de diversas proteínas que estão envolvidas no processo de indução de resistência (LEEMAN et al., 1996, KUMAR et al., 2012 a, b; DIAS et al., 2014, WU et al., 2014). Além disso, promovem antagonismo direto, pela produção de compostos antimicrobianos, bem como, por competição por nutrientes, através da produção de sideróforos (FERNANDO et al., 2007; BERRY et al., 2010). Desta forma, bactérias biocontroladoras, especialmente aquelas que induzem resistência, se destacam por possuírem um amplo espectro de ação, permitindo assim o controle de diferentes doenças de um dado hospedeiro.

Muitos microrganismos têm sido descritos como agentes de controle biológico para *S. sclerotiorum* no feijão e em outros hospedeiros *Bacillus amyloliquefaciens* (ABDULLAH et al., 2008, WU et al., 2014) *B. thuringiensis* (REMUSKA; PRIA, 2007) *Pseudomonas putida* (BARRA, 2008), *P. fluorescens* (LI et al., 2011) *Coniothyrium minitans* (HUANG et al., 2000; LI et al., 2003), *Gliocladium roseum* (HANNUSCH; BOLAND, 1996), *Trichoderma virens* (HUANG et al., 2000), *T. viride* (HANNUSCH; BOLAND, 1996), *T. harzianum* (ILLIPRONTI; MACHADO, 1993, MENENDEZ; GODEAS, 1998), *Talaromyces flavus* (MELO, 1998; HUANG et al., 2000). O uso destes biocontroladores tem levado ao controle como reduzindo a doença através da inibição de germinação de escleródios e inibição do crescimento micelial do fitopatógeno (DE FIGUEIRÊDO et al., 2010; WENTING et al., 2012).

Por outro lado, bactérias biocontroladoras, especialmente aquelas que induzem resistência, podem apresentar um amplo espectro de ação controlando diferentes doenças de um dado hospedeiro. Assim, diferentes isolados de *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus* são descritos por controlar doenças do feijão como cretamento bacteriano comum (ZANATA et al., 2007), antracnose (CORRÊA, et al., 2008), mancha angular, murcha do curtobactério, podridão

cinzenta do caule, murcha de fusário (CORRÊA, et al., 2014) além do nematoide das galhas (CORRÊA et al., 2012).

Considerando a capacidade destes isolados e das combinações de controlar diferentes fitopatógenos do feijão, este trabalho teve por objetivo avaliá-los para o controle de *S. sclerotiorum* a partir da microbiolização de sementes de feijão, por meio de bioensaios com folhas destacadas de feijão, bem como “*in planta*” sob condições parcialmente controladas.

2.2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 - Isolados utilizados e sua manutenção

Os isolados bacterianos utilizados fazem parte da coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, selecionados para biocontrole de doenças do feijão (ZANATTA et al., 2007; CORRÊA et al., 2008; 2012; 2014) (tab. 1).

Tabela 1- Identificação e habitat dos isolados bacterianos utilizados para o biocontrole de *Sclerotinia sclerotiorum*

Isolados	Identificação*	Habitat
DFs093	<i>Bacillus cereus</i>	Solo
DFs348**	<i>Bacillus</i> sp.	Folha de Cebola
DFs513	<i>Pseudomonas veronii</i>	Túnica de cebola
DFs769	<i>B. cereus</i>	Vagem de feijão
DFs831	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Solo rizosférico de feijão
DFs842	<i>P. fluorescens</i>	Folha de feijão
DFs843	<i>Rhodococcus fascians</i>	Folha de feijão
DFs912	<i>R. fascians</i>	Folha de feijão

*Determinados por sequenciamento do gene 16S rDNA (dados não publicados), **Bactéria utilizada somente em combinação

O isolado de *S. sclerotiorum* utilizado foi cedido pela Embrapa Clima Temperado, laboratório Biofábrica, identificado por CPACT 522, isolado de folhas de repolho.

A manutenção dos isolados bacterianos e fúngico foi realizada pelo método de sub-culturas periódicas (DHINGRA; SINCLAIR, 1995) em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e BDA (Batata – Dextrose – Ágar), respectivamente, armazenados em geladeira a 4°C. A longo prazo, a preservação deu-se em água

estéril e em solo armazenados sob temperatura ambiente, e óleo mineral sob refrigeração em geladeira (ROMEIRO, 2007).

2.2.2 - Preparo das suspensões bacterianas e microbiolização das sementes

Isolados bacterianos (tab. 1) foram previamente cultivados em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24 horas. Em seguida, foram preparadas suspensões com solução salina (NaCl 0,85%) para cada um dos isolados sendo as concentrações ajustadas para $A_{540} = 0,50$. Para as combinações dos isolados, foram utilizados 20mL de suspensão de cada um dos isolados, cujas concentrações foram previamente ajustadas, constituindo as combinações C01, C02 e C03 a partir dos isolados Dfs093+Dfs769+Dfs831, Dfs093+Dfs769+Dfs842 e Dfs769+ Dfs831+Dfs348, respectivamente.

Posteriormente, para cada isolado ou combinação, sementes de feijão do cultivar BRS Valente foram imersas nas suspensões e submetidas à agitação pelo período de cinco horas sob temperatura de 10°C. Como testemunhas, foram utilizadas sementes imersas em solução salina (NaCl 0,85%).

2.2.3- Plantio e condução do bioensaio

Após a microbiolização, foram semeadas cinco sementes em vasos com capacidade para 1kg contendo substrato comercial não esterilizado, mantidos em casa de vegetação climatizada. Após a emergência, o desbaste foi realizado deixando-se três plantas por vaso.

2.2.3.1 - Avaliação do biocontrole do mofo branco em folhas destacadas

Após, o pleno desenvolvimento do segundo trifólio das plantas de feijão, os vasos foram levados ao laboratório, onde os trifólios das plantas foram destacados com uma tesoura, e distribuídos em bandejas plásticas (28 x 33 cm) contendo em seu interior papel Germitest previamente umedecidos com 55 mL de água destilada esterilizada.

O isolado fúngico foi cultivado em BDA sob temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 10 dias, com fotoperíodo de 12 horas. Um disco de micélio de 5 mm de diâmetro

foi inoculado no centro de cada folíolo dos trifólios destacados. O ensaio foi conduzido sob condições de temperatura favoráveis para o desenvolvimento de *S. sclerotiorum*, a $25^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 horas.

As avaliações foram realizadas 48, 72 e 96 horas após a inoculação do fungo, medindo-se o diâmetro das lesões presentes nos folíolos (horizontal e vertical) com o uso do paquímetro digital. Especialmente para o bioensaio II, além do diâmetro das lesões, mediu-se a largura das folhas.

Adicionalmente foram avaliadas, a presença ou não de lesões necróticas, nas nervuras secundárias (NS) e central (NC), bem como a formação de micélio (MI) do fungo sobre os folíolos, para avaliação destas variáveis observou-se o número de horas após a inoculação.

2.2.3.2- Delineamento experimental e análises estatísticas

Foram executados dois ensaios com folhas destacadas (Bioensaio I e Bioensaio II), sob as mesmas condições de incubação, mas desenvolvidos em períodos diferentes. Para ambos os bioensaios, o delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, com 11 tratamentos (sete isolados bacterianos, três combinações e uma testemunha). Cada unidade experimental foi representada por duas bandejas plásticas, cada uma, contendo cinco ou seis trifólios, totalizando oito repetições para o bioensaio I, e seis para o bioensaio II. Todas as variáveis foram submetidas a análise de variância e a comparação entre as médias foram avaliadas por Scott Knott a 1% probabilidade. Utilizando-se o programa estatístico Genes (CRUZ, 2006 a).

2.2.4 - Avaliação do biocontrole do mofo branco “*in planta*” em casa de vegetação

2.2.4.1 - Plantio e condução do bioensaio

Em casa de vegetação, quatro sementes de feijão microbiolizadas conforme descrito no item (2.2.2) foram semeadas em vasos plásticos contendo 1 Kg de substrato comercial não esterilizado. Após a emergência, o desbaste foi

realizado deixando-se duas plantas por vaso. Quando as plantas atingiram o estágio V4 foram inoculadas.

2.2.4.2 - Obtenção do inóculo

Escleródios previamente produzidos e armazenados foram postos a germinar em meio de cultura BDA, incubando-os sob temperatura de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, no escuro por cinco dias. Após este período, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram retirados e transferidos para placas de Petri contendo BDA. Estas placas foram incubadas sob mesmas condições por 36 horas. O crescimento fúngico ocorrido nestas placas foi então utilizado para retirada de discos de micélio de 5 mm, os quais foram utilizados na inoculação das plantas de feijão.

2.2.4.3 - Inoculação das plantas de feijão

A inoculação foi realizada em plantas de feijão no estágio V4, mantidas em casa de vegetação. Para tanto, cortou-se o pecíolo do quarto trifólio a 2,5 cm do quarto nó (medido com régua milimetrada). Para a transferência do inóculo e manutenção da umidade, utilizaram-se ponteiras descartáveis de pipetadores (1000 μL), cortadas de forma a eliminar a parte cônica (ficando com o máximo diâmetro). Cada ponteira cortada continha na sua extremidade micélio de *S. sclerotiorum* com 36 horas de cultivo. Estas ponteiras foram inseridas nos segmentos de pecíolo restantes de modo a colocar em contato o micélio fúngico e a planta, além de proteger o pecíolo e manter a umidade neste ponto de contato (PETZOLDT; DICKSON, 1996).

Entre o oitavo e décimo quarto dia após a inoculação, diariamente foram avaliados o comprimento de lesão e a severidade dos sintomas da infecção de *S. sclerotiorum*, utilizando-se a escala de notas adaptada por Petzoldt e Dikson (1996), em que: 1 = plantas sem sintomas; 2 = invasão do fungo além do sítio de inoculação; 3 = invasão do fungo próximo ao primeiro nó; 4 = invasão do fungo até o primeiro nó; 5 = invasão do fungo além do primeiro nó; 6 = invasão do fungo próximo ao segundo nó; 7 = invasão do fungo até o segundo nó; 8 = invasão do fungo além do segundo nó; e 9 = morte da planta.

2.2.4.4 - Delineamento experimental e análises estatísticas

Cada unidade experimental foi representada por um vaso contendo duas plantas, em seis repetições dispostas inteiramente casualizadas.

A partir dos dados de severidade foram calculados o número de dias que as plantas permaneceram vivas, percentual de plantas vivas ao término do ensaio (14 dias após a inoculação), número de dias para a ocorrência do maior comprimento de lesão e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). AACPD foi calculada através da fórmula $AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(x_i + x_{i+1}) \times 0,5] \times [t_{i+1} - t_i]$, onde, n é o número de avaliações, x é a severidade da doença e $[t_{i+1} - t_i]$ é o intervalo de avaliações consecutivas.

Os dados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias por Scott Knott a 1% de probabilidade. Adicionalmente procedeu-se ao cálculo da dissimilaridade das variáveis pela distância de Mahalanobis, da contribuição relativa das variáveis para diferença entre os tratamentos, das variáveis canônicas.

2.3 – RESULTADOS

Do processo da microbiolização de sementes de feijão com isolados bacterianos utilizados individualmente e em combinações a partir de bioensaios com folhas destacadas, no que se refere ao controle de *S. sclerotiorum* de modo geral, os tratamentos não promoveram um controle efetivo, no entanto algumas diferenças significativas foram observadas entre os tratamentos biocontroladores e a testemunha em algumas variáveis dos bioensaios (bioensaio I e II).

No bioensaio I (tab. 2), observou-se uma tendência de redução dos diâmetros médios das lesões. Os tratamentos DFs831 e DFs93 apresentaram lesões menores após 48 e 72 horas reduzindo em 33 e 18% ou 30 e 17% respectivamente. No entanto, no bioensaio II (tab.3), as menores lesões observadas após 48 horas foram para as combinações C01 (13%); C02 (11%); C03 (14%), tendências que se repetem após 72 horas, C01(13%), C02(10%), C03 (11%) e de modo semelhante ao bioensaio I não houve diferença significativa, embora os valores mensurados no tratamento testemunha tenham sido os mais elevados (tab. 3). A avaliação do diâmetro relativo da necrose em relação ao da folha (C48 e C72) não mudou este panorama, mantendo não significativas as diferenças observadas.

Por outro lado, as demais variáveis avaliadas resultaram em comportamento diverso quando se consideram os dois bioensaios (tab.2 e tab.3). Para a variável o número de horas onde ocorrem o colapso das folhas (HV), houve diferença estatística no bioensaio II (tab. 3) e o tratamento DFs842 manteve as folhas destacadas vivas por um período de 56 horas após inoculação do patógeno (16% a mais), diferenciando significativamente dos demais tratamentos, enquanto que no bioensaio I (tab. 2) este foi o tratamento onde as folhas apresentaram tendência contrária e permaneceram vivas por menos tempo.

Quando se considera a ocorrência de necroses nas nervuras secundárias (NS) e central (NC), percebe-se que o maior tempo para ocorrência destas necroses, acontece para os mesmos tratamentos dentro de um bioensaio. No bioensaio I seis tratamentos foram estatisticamente significativos para NC (até 25% de aumento), embora apenas um deles (DFs843) tenha apresentado a mesma tendência no bioensaio II.

Ao considerar ocorrência de micélio sobre as lesões, verificam-se diferenças significativas somente no bioensaio I (tab.2), onde três tratamentos retardaram a formação de micélio sobre as lesões (variando de 9 a 27% de aumento). Destes, DFs843 e C01 também aumentaram significativamente o tempo para ocorrência de necrose nas nervuras central.

Tabela 2 – Efeito da microbiolização de sementes de feijão com tratamentos bacterianos no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir da inoculação em folhas destacadas, bioensaio I mantidas em câmara de incubação a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas.

Tratamentos	L48 ^{ns}	L72 ^{ns}	HV ^{ns}	NS ^{ns}	NC	MI		
DFs093	9,2	24,7	78,0	57,0	57,0*	a	48,0	b
DFs513	10,4	25,7	84,0	48,0	48,0	b	72,0	a
DFs769	10,1	26,7	90,0	48,0	48,0	b	57,0	b
DFs831	8,8	24,3	84,0	57,0	57,0	a	57,0	b
DFs842	8,5	29,1	72,0	60,0	57,0	a	66,0	b
DFs843	11,9	29,8	84,0	51,0	60,0	a	84,0	a
DFs912	11,4	28,6	90,0	51,0	51,0	b	66,0	b
C01	12,4	30,6	84,0	51,0	57,0	a	75,0	a
C02	12,2	31,1	78,0	57,0	60,0	a	57,0	b
C03	11,8	29,2	72,0	51,0	51,0	b	66,0	b
Testemunha	13,2	29,8	90,0	48,0	48,0	b	66,0	b
CV (%)	33,9	24,0	24,3	18,8	19,8	23,3		

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade. DFs93 - *Bacillus Cereus*; DFs348- *Bacillus sp.*; DFs513 - *Pseudomonas veronii*; DFs769- *Bacillus cereus*; DFs831 - *Pseudomonas fluorescens*; DFs842 - *Pseudomonas fluorescens*; DFs843 - *Rhodococcus fasciens*; DFs912 - *Rhodococcus fasciens*; C01 (DFs093+DFs769+DFs831); C02 (DFs093+DFs769+DFs842); C03 (DFs348+DFs769+DFs831). L48 – diâmetro médio da lesão 48 horas após a inoculação; L72– diâmetro médio da lesão 72 horas após a inoculação; HV – número de horas que as folhas destacadas permaneceram vivas após inoculação; NS - número de horas após a inoculação para ocorrência de necrose nas nervuras secundárias; NC - número de horas após a inoculação para ocorrência de necrose na nervura central; MI- número de horas após a inoculação para ocorrência de micélio sobre as lesões

Tabela 3 – Efeito da microbiolização de sementes de feijão com tratamentos bacterianos no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* a partir da inoculação em folhas destacadas, bioensaio II mantidas em câmara de incubação a 25±2°C e fotoperíodo de 12 horas.

Tratamento	L48 ^{ns}	L72 ^{ns}	C48 ^{ns}	C72 ^{ns}	HV		NS ^{ns}	NC ^{ns}	MI ^{ns}
DFs093	19,4	32,6	0,58	0,29	48,0*	b	48,0	52,0	108,0
DFs513	18,3	31,4	0,59	0,32	48,0	b	48,0	60,0	116,0
DFs769	18,5	32,1	0,58	0,32	48,0	b	48,0	56,0	104,0
DFs831	18,6	30,4	0,52	0,32	48,0	b	48,0	48,0	108,0
DFs842	18,2	30,7	0,60	0,39	56,0	a	48,0	56,0	120,0
DFs843	19,3	33,4	0,57	0,35	48,0	b	48,0	60,0	112,0
DFs912	18,3	32,2	0,62	0,36	48,0	b	48,0	48,0	108,0
C01	17,5	28,8	0,63	0,43	48,0	b	48,0	48,0	116,0
C02	17,9	29,9	0,57	0,34	48,0	b	48,0	56,0	112,0
C03	17,2	29,6	0,60	0,38	48,0	b	52,0	72,0	116,0
Testemunha	20,1	33,1	0,53	0,29	48,0	b	48,0	48,0	112,0
CV (%)	15,7	14,1	15,7	32,9	13,9		7,7	6,1	10,1

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 1% de probabilidade. DFs93 - *Bacillus Cereus*; DFs348- *Bacillus sp.*; DFs513 - *Pseudomonas veronii*; DFs769 – *Bacillus cereus*; DFs831 - *Pseudomonas fluorescens*; DFs842 - *Pseudomonas fluorescens*; DFs843 - *Rhodococcus fasciens*; DFs912 - *Rhodococcus fasciens*; C01 (DFs093+DFs769+DFs831); C02 (DFs093+DFs769+DFs842); C03 (DFs348+DFs769+DFs831). L48 – diâmetro médio da lesão 48 horas após a inoculação; L72– diâmetro médio da lesão 72 horas após a inoculação; C48 - Coeficiente de folha sadia após 48 horas de inoculação; C72- Coeficiente de folha sadia após 72 horas de inoculação; HV – número de horas que as folhas destacadas permaneceram vivas após inoculação; NS - número de horas após a inoculação para ocorrência de necrose nas nervuras secundárias; NC - número de horas após a inoculação para ocorrência de necrose na nervura central; MI- número de horas após a inoculação para ocorrência de micélio sobre as lesões.

De modo distinto, nos ensaios que objetivaram o biocontrole do mofo branco “*in planta*” observou-se que para a maioria das variáveis houve diferenças estatísticas. Adicionalmente os tratamentos com melhor desempenho foram DFs769, DFs842, DFs912 e C03 para todos os aspectos avaliados (tab. 4).

Considerando as variáveis que mostram a sobrevivência das plantas inoculadas com *S. sclerotiorum*, observou-se que quatro tratamentos (DFs769, DFs842, DFs912, C03) resultaram em número maior de dias em que as plantas permaneceram vivas (DV) e maior percentual de plantas vivas (%V). Em média

este grupo estatisticamente superior aumentou 11,4% o número de dias e quadruplicou o percentual de plantas vivas ao final da avaliação (tab.4)

O número de dias para a ocorrência da estabilização da expansão da lesão (DML) variou pouco (8,2 a 10,6) não se observando diferenças estatísticas. No entanto, houve variação no comprimento das lesões, formando assim três grupos de tratamentos, sendo o de melhor desempenho formado pelos tratamentos DFs912 e C03, com redução média da expansão da lesão de 46% (tab. 4).

A severidade, ao longo de seis avaliações mostrou-se crescente para todas as plantas. No oitavo dia nenhum tratamento reduziu a severidade dos sintomas do mofo branco. A partir de então (S9, S10, S11, S12), foi possível observar um grupo ao qual diferenciou-se dos demais, formado por até seis tratamentos, destacando-se DFs769, DFs842, DFs912 e C03 superiores nestas quatro avaliações. Deste modo o impacto sobre a severidade em dias individuais (S8 a S13) refletiu no efeito acumulado (AACPD). Estando os tratamentos C03, DFs912, DFs842 os que apresentaram as maiores reduções de AACPD para *S. sclerotiorum* variando de 31,6 a 19,1%. Adicionalmente, a contribuição relativa da AACPD para as diferenças entre os tratamentos foi de praticamente 50%.

De modo geral, os tratamentos que reduziram o progresso do mofo branco resultaram em maior massa seca (exceto DFs513 e DFs842), sendo que os demais (C03, DFs912, DFs831, DFs842) os que proporcionaram incrementos que variaram entre 167 a 49% (97,5% em média).

Tabela 4 – Efeitos da inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijão cultivar BRS Valente em casa de vegetação, anteriormente microbiolizadas com bactérias mensurados pelo número de dias após a inoculação em que as plantas permaneceram vivas (DV), percentagem de plantas vivas 14 dias após inoculação (%V), comprimento da lesão no ponto de inoculação (CL), número de dias onde ocorreu o maior tamanho de lesão (DML), severidade 8, 9, 10, 11, 12 e 13 dias após a inoculação respectivamente (S8, S9, S10, S11, S12 e S13), área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), massa seca de plantas 14 dias após a inoculação (MS). Plantas conduzidas em casa de vegetação climatizada, inoculadas no pecíolo da quarta folha trifoliolada pela técnica desenvolvida por (Petzoldt; Dickson, 1996).

Tratamento	DV	%V	CL	DML ^{ns}	S8	S9	S10	S11	S12	S13 ^{ns}	AACPD	MS
DFs093	9,3* b	0 b	4,1 a	8,4	7,9 a	8,0 a	8,0 a	8,8 a	9,0 a	9,0	42,25 a	0,567 b
DFs513	10,1 b	0 b	3,0 a	9,0	5,8 b	6,2 a	6,3 b	7,2 a	7,4 b	7,7	33,85 b	0,524 b
DFs769	11,5 a	40 a	2,6 b	10,2	4,8 b	5,3 b	5,7 b	6,9 b	7,5 b	7,8	31,70 b	1,288 a
DFs831	10,5 b	10 b	2,5 b	9,0	5,2 b	6,1 a	6,3 b	6,9 b	7,5 b	7,7	33,25 b	1,587 a
DFs842	11,8 a	30 a	3,7 a	10,6	4,2 b	4,9 b	5,8 b	6,1 b	6,8 b	7,7	29,55 b	1,057 b
DFs843	9,1 b	0 b	3,9 a	8,2	7,5 a	7,8 a	8,0 a	9,0 a	9,0 a	9,0	42,05 a	0,539 b
DFs912	11,5 a	30 a	1,5 c	9,6	4,3 b	4,8 b	5,1 b	5,6 b	6,9 b	7,5	28,30 b	1,637 a
C01	10,1 b	10 b	2,5 b	9,0	6,1 b	6,6 a	7,1 a	7,5 a	8,4 a	8,6	36,95 a	0,663 b
C02	10,1 b	10 b	3,0 a	8,6	5,4 b	6,4 a	6,8 a	7,8 a	8,6 a	8,6	36,60 a	0,776 b
C03	12,4 a	60 a	1,3 c	10,6	3,7 b	4,8 b	5,1 b	5,7 b	6,2 b	6,6	24,95 b	2,301 a
Testemunha	10,3 b	10 b	2,6 b	8,8	5,8 b	6,4 a	6,9 a	7,6 a	8,4 a	8,6	36,50 a	0,862 b
Percentagem* contribuição	0,08	0,05	0,1	0,01	7,05	9,98	10,58	10,05	8,03	4,21	46,82	0,03
CV (%)**	13,0	35,9	34,1	17,5	32,6	23,9	21,0	17,8	15,6	16,1	18,6	76,1

*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 1% de probabilidade. DFs93- *Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs769 - *Bacillus cereus*; DFs831- *Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843 - *Rhodococcus fasciens*; DFs912-*Rhodococcus fasciens*; C01(DFs093+DFs769+DFs831); C02(DFs093+DFs769+DFs842); C03 (DFs348+DFs769+DFs831); *Contribuição relativa das variáveis para a diferença entre tratamentos calculadas segundo Singh (1981) a partir da dissimilaridade dada pela distância de Mahalanobis; **Coeficiente de variação.

A análise de variáveis canônicas foi satisfatória, uma vez que os três primeiros componentes retiveram, sozinhos, 82,15% da variação original (tab. 5). Nesta análise a formação de grupos é um critério subjetivo (CRUZ, 2006 b), e, como a visualização de grupos de tratamentos bacterianos não foi muito clara (Figura 1), conjugaram-se esses resultados aos de análise de agrupamento como recomenda, Liberato et al. (1995).

Tabela 5 – Estimativa de variância associada às variáveis canônicas de biocontrole em plantas de feijão inoculadas com *Sclerotinia sclerotiorum*. Plantas conduzidas em casa de vegetação climatizada, inoculadas no pecíolo da quarta folha trifoliolada pela técnica desenvolvida por Petzoldt; Dickson (1996).

Autovalor	Variância (%)	Acumulada (%)
2,060	45,93	45,93
1,056	23,54	69,48
0,568	12,67	82,15
0,344	7,68	89,84
0,173	3,86	93,70
0,127	2,84	96,55
0,107	2,40	98,96
0,025	0,56	99,52
0,013	0,30	99,83
0, 007	0,16	100
0,0	0	100
0,0	0	100

A análise de agrupamento pelo método de Tocher formou três grupos com efeito biocontrolador distinto: DFs912 e C03 permaneceram no mesmo grupo, DFs842 foi o único tratamento do seu grupo; e os demais tratamentos bacterianos formaram o outro grupo (tab. 6).

Tabela 6 - Tratamentos bacterianos agrupados pelo método de Tocher, considerando valores gerados a partir de dados de severidade do mofo branco em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas com bactérias, mantidas em casa de vegetação climatizada e cujos pecíolos das quartas folhas foram inoculados pela técnica desenvolvida por Petzoldt; Dickson (1996)

Grupo	Tratamentos
1	93, 513, 769, 831, 843, C01, C02, testemunha
2	912, C03
3	842

DFs93 - *Bacillus Cereus*; DFs513 - *Pseudomonas veronii*; DFs769 - *Bacillus cereus*; DFs831- *Pseudomonas fluorescens*; DFs842 *Pseudomonas fluorescens*; DFs843 - *Rhodococcus fasciens*; DFs912-*Rhodococcus fasciens*; C01(DFs093+DFs769+DFs831); C02(DFs093+DFs769+DFs842); C03 (DFs348+DFs769+DFs831).

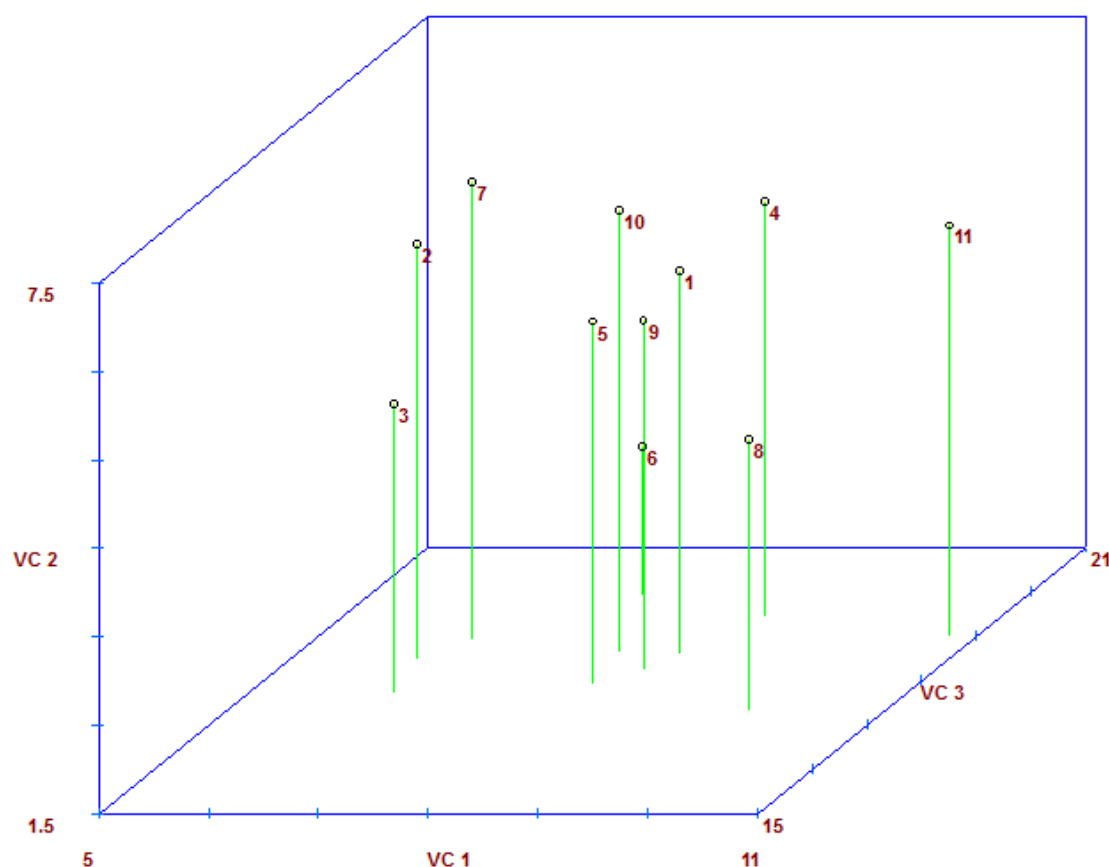


Figura 1 - Dispersão gráfica de onze tratamentos bacterianos em relação às três variáveis canônicas (VC1, VC2 e VC3). Valores gerados a partir de dados de severidade do mofo branco em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas com bactérias, mantidas em casa de vegetação climatizada e cujos pecíolos das quartas folhas foram inoculados pela técnica desenvolvida por Petzoldt; Dickson (1996). Testemunha (1); DFs93- *Bacillus cereus* (2); DFs513 - *Pseudomonas veronii* (3); DFs769 - *Bacillus cereus* (4); DFs831- *Pseudomonas fluorescens* (5); DFs842 -*Pseudomonas fluorescens* (6); DFs843 - *Rhodococcus fasciens* (7); DFs912 - *Rhodococcus fasciens* (8); C01 (DFs093+DFs769+DFs831) (9); C02 (DFs093+DFs769+DFs842) (10); C03 (DFs348+DFs769+DFs831) (11).

2.3.1- DISCUSSÃO

O processo de seleção de biocontroladores não é uma tarefa fácil, portanto há que se buscar metodologias que viabilizem o estudo de grande número de microrganismos candidatos. Assim sendo, o desenvolvimento de bioensaios com folhas destacadas consiste em uma alternativa viável, por permitir diferentes estudos, inclusive a seleção de microrganismos com potencial de biocontrole de doenças de plantas.

Neste sentido, experimentações com folhas destacadas ao longo dos anos têm possibilitado seleção agentes de controle biológico para o mofo branco. Como por exemplo, Wu e colaboradores (2014) em ensaios com folhas destacadas de canola, evidenciaram a capacidade *Bacillus sp.* em reduzir aproximadamente 85% o mofo branco quando aplicado via pulverização das folhas. Em soja, Zang e Xue (2010), através de bioensaios via pulverização de *B. subtilis* em folhas destacadas observaram 90% de redução da severidade de sintomas causados por *S. sclerotiorum*. Também com folhas destacadas de canola, oriundas de sementes microbiolizadas por diferentes isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus*, Sangiogo e colaboradores (2014), observaram percentuais de biocontrole de *S. sclerotiorum*, de até 100%.

O uso de folhas destacadas de feijão foi explorado por vários autores. Usando desta estratégia foi possível selecionar bactérias para o controle da ferrugem do feijão (BAKER et al., 1983; CENTURION; KIMATI, 1994; MIZUBUTI et al., 1995), bem como para o controle do crestamento bacteriano comum (ZANATA et al., 2007).

As bactérias utilizadas no presente trabalho foram selecionadas primeiramente para o controle de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* partir de bioensaios com folhas destacadas (ZANATTA et al., 2007). Estes autores puderam avaliar o efeito dos biocontroladores por até 10 dias, ressaltando que as folhas

permaneceram verdes e túrgidas ao longo deste período. No entanto, nos bioensaios desenvolvidos no presente trabalho observou-se o rápido progresso da infecção e consequente colapso das folhas de feijão. Esta rapidez dificultou as avaliações, não permitindo detectar diferenças significativas nos diâmetros das lesões formadas ao redor do disco de micélio de *S. sclerotiorum*. A avaliação de outras variáveis associadas à infecção embora tenha resultado em diferenças significativas, não apresentaram consistência de resultados quando se comparou os bioensaios I e II desenvolvidos com folhas destacadas.

No entanto, no ensaio *in planta* conduzido no presente trabalho, foi possível observar um comportamento significativamente distinto entre os tratamentos. Adicionalmente, também se verificou consistência entre as variáveis, uma vez que, quando comparado à testemunha cada tratamento apresentou comportamento estável para a maioria das variáveis avaliadas, isto é: ou predominantemente era superior à testemunha, ou dominantemente similar.

Assim, foi possível visualizar os tratamentos que se destacaram quando se analisou individualmente cada variável (comparação de médias), bem como quando as variáveis foram condensadas (análises canônicas e de agrupamento por Tocher). Assim, individualmente os melhores tratamentos foram C03, DFs912 e DFs842, nesta ordem; e em conjunto, C03 e DFs912 se equivaleram e DFs 842 se separou destes e dos demais tratamentos. De certo modo, os resultados apresentados pelo tratamento C03 neste trabalho justificam-se por este consistir em uma combinação de isolados *Bacillus cereus* (DFs769), *Bacillus sp.* (DFs348) e *Pseudomonas fluorescens* (DFs831), espécies conhecidas pela capacidade de biocontrole de diferentes doenças do feijão e detentores de uma ampla variedade de atividades antagonísticas (ZANATA et al., 2007; CORRÊA et al., 2008, 2012, 2014). Os mecanismos exatos pelos quais as combinações de microrganismos proporcionam controle biológico de doenças ainda não são totalmente entendidos, embora existam algumas hipóteses, incluindo o sinergismo através da ação de metabólitos como antibióticos, antifúngicos, enzimas hidrolíticas (DUFFY; WELLER, 1995; DUFFY et al., 1996; PIETERSEN et al., 2002).

Assim sendo, este resultado pode também ser explicado pela diversidade de habilidades *in vitro* apresentada pelos isolados que compõem esta combinação, os quais foram destacados em ensaios realizados por Corrêa et al. (2006) que demonstraram a capacidade destes isolados DFs769 e DFs831 para

produção de compostos associados ao parasitismo. Neste sentido, o uso de combinações ao longo dos anos tem indicado ser um método eficiente e estável, por explorar a utilização de isolados capazes de produzir diferentes compostos envolvidos no biocontrole de doenças. Além disso, vários trabalhos sugerem que a utilização de combinações com agentes de biocontrole é mais eficaz para patógenos habitantes de solo do que o uso de um único agente (FUKUI et al., 1994; PIERSON; WELLER, 1994, DUFFY et al., 1996).

Adicionalmente, Corrêa et al. (2014) observaram que a combinação C01 que possui em comum dois dos três componentes da combinação C03 (DFs769 e DFs831) controlou importantes doenças do feijão como mancha angular, murcha de *curtobacterium*, podridão cinzenta do caule, murcha de fusário, indicando ter ocorrido efeito aditivo entre os diferentes isolados que compõem a combinação. Todos estes resultados reforçam a ideia de que o uso de combinações de bactérias geralmente resulta em aumento da eficiência, e/ou estabilidade, e/ou espectro de ação dos biocontroladores, por explorar a diversidade de mecanismos de ação, que em conjunto estas possuem (GUETSKY et al., 2002; BOER et al., 2003).

A utilização de combinações objetivando o biocontrole de *S. sclerotiorum* tem demonstrado resultados promissores. Bahkali et al. (2014) destacaram a utilização de combinações diferentes de antagonistas *T. hamatum* e *Streptomyces griseovirides*, além de *C. minitans* e *S. griseovirides*, estas foram capazes de reduzir 100% a incidência da doença em plantas de feijão. Neste mesmo trabalho, a combinação de *G. virens* e *P. fluorescens* foi responsável por reduzir 75% da incidência de *S. sclerotiorum* quando comparadas aos controles.

Para outros fitopatógenos o uso de combinações também tem se destacado, Domenech e colaboradores (2006) em casa de vegetação observaram que a combinação dos isolados de *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *P. fluorescens* promoveu biocontrole da murcha-de-fusário em tomate e o tombamento de plantas de pimenta por *Rhizoctonia*, justificando seus resultados pela ocorrência de um efeito sinérgico entre os isolados. Tayal e colaboradores (2011), utilizando combinação de dois isolados fúngicos e um bacteriano (*T. viride*/ *Glomus fasciculatum*/ *P. fluorescens*) observaram que a combinação foi também responsável por reduzir 94% da murcha-de-fusário do tomateiro.

A combinação de agentes de biocontrole é uma opção que proporciona no controle biológico, maior estabilidade, devido ao espectro de ação dos isolados tornar-se amplo (BOER et al., 2003; GUETSKY et al., 2001; ELAD et al., 1994). Diante do conjunto de resultados obtidos no presente trabalho, foi possível observar que alguns tratamentos bacterianos indicaram reduções significativas do mofo branco em plantas de feijão, principalmente quando utilizados em combinações, concordando com trabalhos anteriores que evidenciam os benefícios promovidos por estes isolados quando utilizados em combinações. Além disso, observou-se neste trabalho que a microbiolização de sementes de feijão com bactérias consiste em um modo de aplicação eficiente para o controle biológico de *S. sclerotiorum*, embora ainda sejam necessários estudos que demonstrem seu potencial em condições de campo.

2.4 - CONCLUSÕES

A microbiolização de sementes de feijão BRsValente com a combinação C03 e o tratamento DFs912 apresentaram potencial para o biocontrole do mofo branco, em plantas de feijão.

Há pouca relação entre os bioensaios *in vitro* e o ensaio “*in planta*” em relação ao biocontrole do mofo branco por isolados bacterianos.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE ISOLADOS BIOCONTROLADORES DE DOENÇAS DO FEIJÃO

3.1 - INTRODUÇÃO

A busca pelo biocontrole de fitopatógenos tem revelado uma gama de agentes capazes de exercer diferentes mecanismos de ação dentre bactérias (ROMEIRO et al., 2000; LANNA FILHO et al., 2010; WU et al., 2014), fungos (HUANG et al., 2000; MOHAMED; HAGGAG, 2006) e leveduras (ELAD et al., 1994).

Dentro deste contexto, as bactérias são responsáveis pelas atividades de biocontrole que abrangem antagonismo, competição, indução de resistência. Destaque para bactérias habitantes da rizosfera denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, também denominadas PGPR (KLOEPPER; SCHROTH, 1978). Entre as diferentes PGPR citam-se, *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcous*, *Pseudomonas* e *Serratia* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; KUMAR et al., 2012 a). Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são os mais estudados, por produzirem uma gama de compostos relacionados ao biocontrole de diferentes fitopatógenos (KUMAR; DUBE, 1992; ALAMRI et al., 2012; KUMAR et al., 2012 a, b; OLIVEIRA et al., 2013).

Neste sentido, *Bacillus spp.* são descritas por agir significativamente por antibiose, através da produção de metabólitos secundários e geralmente também por parasitismo e competição (EARL et al., 2008; XU et al., 2013), sendo as espécies mais experimentadas *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* e *B. pumilus* (YU et al., 2002, YANG et al., 2009).

Dentre a diversidade de metabólitos antifúngicos produzidos por *Bacillus* spp. encontram-se os lipopeptídeos das famílias da bacilomicina, mersacidina, surfactina, iturina, fengicina, que embora possuam semelhanças estruturais, diferem em alguns aspectos biológicos em relação à sua atividade (STEIN, 2005). Além disso, estas espécies destacam-se também pela produção de outros importantes metabólitos como ácido cianídrico (HCN), sideróforos (YU et al., 2010), enzimas hidrolíticas (SENTHILKUMAR et al., 2009).

De modo semelhante, *Pseudomonas* spp. também produzem importantes metabólitos tais como, sideróforos (YASMIN et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2015), enzimas como celulasas, proteases, β – glucanases e quitinases (DOWLING; O'GARA, 1994; THOMASHOW; WELLER, 1995; HAAS; D'EFAGO, 2005), compostos tóxicos (GUETSKY et al., 2001), além de antibióticos fenazina, fluroglucionol e pioluterina (WELLER; TOMASHOW, 1994; HERNÁNDEZ et al., 2015), bem como podem ativar mecanismos de resistência (BAKKER et al., 2007; BAKKER et al., 2013).

Por este motivo, estudos complementares *in vitro* são importantes pois possibilitam conhecer os prováveis mecanismos de ação dos biocontroladores frente a novos patógenos desafiadores (MARIANO et al., 1993; ALAMRI et al., 2012). Alguns isolados avaliados neste ensaio destacam-se por controlar importantes doenças do feijão tais como cretamento bacteriano comum (ZANATTA et al., 2007), antracnose (CORRÊA et al., 2008) mancha angular, podridão cinzenta, murcha de *Curtobacterium*, murcha de fusário (CORRÊA et al., 2014). Além de, também ativar mecanismos de defesa das plantas e induzir resistência sistêmica (SILVA et al., 2008).

Assim o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a produção de compostos relacionados com o controle biológico de *S. sclerotiorum*, por isolados bacterianos selecionados para biocontrole de diferentes doenças do feijão.

3.2 - MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 - Isolados utilizados

Os isolados utilizados (tab. 7) pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, reconhecidamente capazes de exercer biocontrole de diferentes doenças do feijoeiro (ZANATTA et al., 2007; CORRÊA et al., 2008; 2012; 2014).

Tabela 7 - Identificação dos isolados utilizados e respectiva procedência de isolamento

Isolados	Identificação*	Procedência
DFs093	<i>Bacillus cereus</i>	Solo
DFs348	<i>Bacillus</i> sp.	Folha de Cebola
DFs513	<i>Pseudomonas veronii</i>	Túnica de cebola
DFs769	<i>Bacillus cereus</i>	Vagem de feijão
DFs831	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Solo rizosférico de feijão
DFs842	<i>P. fluorescens</i>	Folha de feijão
DFs843	<i>Rhodococcus fascians</i>	Folha de feijão
DFs912	<i>R. fascians</i>	Folha de feijão

* Determinada por sequenciamento do gene 16S rDNA (dados não publicados).

3.2.2 - Avaliação da produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitopatógenos e promoção de crescimento de plantas (CRBCPC)

Foi avaliada a capacidade das bactérias biocontroladoras em produzir enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos. Para tanto, foi utilizado um ou

mais meios específicos para cada composto. Quando foram utilizados meios em placas, estas foram vertidas 18 horas antes do uso e mantidas a 28°C para redução da umidade superficial, de modo a evitar o espalhamento excessivo dos isolados de *Bacillus*. Nestas placas diferentes bactérias foram semeadas, em pequenos círculos, três isolados de *Bacillus* (DFs93/DFs348/DFs769), dois de *R. fasciens* (DFs348/DFs912) e três de *Pseudomonas* (DFs513/DFs831/DFs842). A estas placas adicionou-se uma bactéria com atividade sabidamente positiva e outra negativa, usadas como controles da avaliação.

Para cada avaliação foram utilizadas seis repetições, dispostas em delineamento inteiramente casualizado. As avaliações foram realizadas após diferentes tempos de incubação, estabelecidos em função do composto avaliado e metodologia usada. Quando possível, foram realizadas avaliações quantitativas medindo-se os diâmetros das colônias ($\varnothing C$) e dos halos formados ($\varnothing H$) no meio em dois sentidos diametralmente opostos, utilizando-se paquímetro digital. Neste caso, os resultados foram expressos como diâmetro relativo de halo ($\varnothing RH$) calculado pela seguinte fórmula: $\varnothing RH = (\varnothing H - \varnothing C) / \varnothing C$. As avaliações qualitativas foram registradas como ocorrência ou não, e caso positivo, também se determinou o número de horas para a visualização do resultado positivo.

3.2.3 - Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas

3.2.3.1 - Hidrólise de carboidratos

Foi avaliada a capacidade de hidrolisar carboidratos estruturais (celulose, glucana e quitina) e não estrutural (amido). Para avaliar a produção de amilases, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-amido, logo incubados sob temperatura de 28°C, no escuro, por quatro dias. Passado esse período adicionou-se solução lugol, por aproximadamente um minuto. A produção de amilases, foi verificada pela presença de um halo de degradação ao redor das colônias (MARIANO; SILVEIRA, 2005), registrando-se os diâmetros das colônias e dos halos formados no meio.

Para avaliação da produção de enzimas celulolíticas, utilizou-se o meio de cultura carboximetilcelulose (KASANA et al., 2008) incubando-se as placas

semeadas sob temperatura de 28°C por dois dias. Após esse período, adicionou-se solução lugol, por aproximadamente um minuto, e avaliou-se a produção de celulasas, a partir da presença de um halo translúcido ao redor das colônias. Posteriormente, os diâmetros das colônias e dos halos presentes no meio foram mensurados.

Para avaliação da produção de glucanases, utilizou-se o meio de cultura MLN, usando como única fonte de carbono laminarina (β -1,3-glucano – SIGMA®) (CATELLAN, 1999). As placas foram semeadas e incubadas à 28°C, por três dias. Para avaliação foi adicionada solução de vermelho Congo, e deixado em temperatura ambiente por 90 minutos. A presença de halo amarelo-alaranjado ao redor das colônias foi considerado positivo (+), havendo assim hidrólise de β -1,3-glucano.

Finalmente, para a produção de quitinases dos isolados foi utilizado o meio de quitina a 0,5 %, cuja única fonte de carbono foi à quitina (SIGMA®), de acordo com a metodologia descrita por Cattelan (1999). As placas foram semeadas e incubadas a 28°C, por 21 dias. A formação de halos de degradação ao redor das colônias foi considerado como resultado positivo (+).

3.2.3.2 - Hidrólise de proteínas

Foi avaliada a capacidade proteolítica utilizando-se três substratos diferentes: caseína, esculina e gelatina. Para avaliação da capacidade de degradação de caseína pelos isolados biocontroladores, testou-se o meio de cultura Leite-Ágar (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Os isolados biocontroladores foram semeados e incubados a 28°C, pelo período de seis dias. A avaliação da hidrólise, foi realizada pela observação de alteração do meio, de leitoso para translúcido (SCHAAD et al., 2001), indicando o resultado positivo. Posteriormente, os diâmetros das colônias e dos halos presentes no meio foram mensurados.

Para verificar a hidrólise de esculina os isolados foram semeados em placas de Petri, e incubados sob temperatura de 28°C no escuro, por quatro dias. Para observação dos resultados utilizou-se luz UV, a mudança de coloração do meio de fluorescente para escuro ao redor das colônias, indicou a hidrólise de esculina. Em razão da formação difusa dos halos não foi possível realizar mensuração destes,

sendo atribuído positivo para os isolados que apresentaram coloração escura ao seu redor, e negativo para aqueles que mantiveram a fluorescência.

A proteólise de gelatina foi avaliada em tubos de ensaio contendo 4 mL de meio de gelatina (MARIANO; SILVEIRA, 2005). Após incubação sob temperatura de 28°C no escuro, 72 e 96 horas, foram realizadas as avaliações colocando-se os tubos em geladeira por 30 minutos. Consistiram-se em reações positivas aquelas onde o meio manteve-se sob forma líquida e, negativas, aquelas em que meio solidificou.

3.2.3.3 - Hidrólise de lipídeos

A produção de lecitinases foi determinada semeando-se os isolados biocontroladores no meio de cultura ágar - nutriente adicionado de solução de gema de ovo a 4%, e incubando-os sob temperatura de 28°C no escuro, por seis dias (SCHAAD et al., 2001). A avaliação positiva foi baseada na presença de halo de degradação presente no meio ao redor das colônias. Posteriormente, os diâmetros das colônias e dos halos presentes no meio foram mensurados.

A capacidade lipolítica também foi avaliada utilizando-se o meio de cultura de Tween 80 (FAHY; PERSLEY, 1983), após incubação sob temperatura de 28°C no escuro, por 6 dias. Como resultado positivo, observou-se o desenvolvimento de um precipitado branco leitoso ao redor das colônias, o que indicou a capacidade do biocontrolador de hidrolisar o lipídio Tween 80. Devido à formação de halo com bordos irregulares e não nítidos a avaliação foi qualitativa (positivo ou negativo).

3.2.3.4 - Produção de compostos antimicrobianos

Foi avaliada a produção de alguns compostos frequentemente associados à antibiose (compostos tóxicos e ou com atividade inibitória como amônia e antibióticos) e à competição (sideróforos).

Para avaliar a habilidade dos isolados biocontroladores em competir por Fe^{+3} utilizou-se o meio King B + azul de cromoazurol (SCHWYN; NEILANDS, 1987). Os isolados biocontroladores foram semeados nas placas, incubados a 28°C no escuro por sete dias. A presença de halo avermelhado ao redor das colônias indicou que o

biocontrolador foi capaz de quelar Fe^{+3} . A avaliação desta capacidade foi quantitativa.

A capacidade antibiótica pela produção de compostos não voláteis foi avaliada por confronto em placas contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) onde os isolados biocontroladores foram repicados e incubados a 28°C no escuro por 72 horas. Posteriormente, discos de 5 mm de micélio de *S. sclerotiorum* com 5 dias de cultivo foram dispostos no centro das placas, anteriormente repicadas com os isolados biocontroladores. Como testemunha um disco de micélio foi semeado no centro de uma placa contendo meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) sem o crescimento prévio dos isolados biocontroladores. As placas foram então incubadas de acordo com as condições de crescimento para *S. sclerotiorum*, ou seja, temperatura de 25°C $\pm$ 2°C no escuro. As avaliações ocorreram quando o fungo da placa testemunha atingiu o bordo das placas. A presença de halo de inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* pela ação dos compostos produzidos pelos isolados biocontroladores, indicou antibiose, que foi determinada de forma qualitativa.

A produção de compostos tóxicos foi determinada pela avaliação da produção de amônia. Para tanto, os isolados biocontroladores foram repicados em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo de peptona incubados em agitador orbital com agitação contínua. As avaliações foram efetuadas após 24 e 48 horas, retirando-se alíquotas de 1000 μL dos cultivos e adicionando-se 100 μL de reagente de Nessler (MARIANO; SILVEIRA, 2005). As avaliações foram qualitativas, observando-se a ocorrência (+) para aqueles isolados que formaram o precipitado amarelo alaranjado, ou não (-), para aqueles que mantiveram a coloração do meio.

3.3 - RESULTADOS

De forma geral, todos os isolados foram capazes de produzir algum composto que possa estar envolvido no controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*. Todos os isolados apresentaram atividade hidrolítica, porém nos testes utilizados não foi possível detectar produção de quitinases e glucanases pelos isolados (tab.8).

Dos oito isolados bacterianos avaliados, três proporcionaram maior diversidade de compostos envolvidos com controle biológico DFs93, DFs348 e DFs769 (*B. cereus*, *Bacillus sp.* e *B. cereus*) representando 72,5% dos compostos avaliados, capazes de hidrolisar amido, celulose, além das proteínas caseína, esculina e gelatina. De certo modo, destacaram-se também por hidrolisar lipídeos lecitina e Tween80, além de produzirem amônia, e sideróforos (exceto DFs93).

Por outro lado, DFs912 (*R. fasciens*) apresentou o maior coeficiente para hidrólise de caseína em relação aos demais isolados avaliados, além de ter sido o maior coeficiente apresentado entre todas as avaliações das atividades hidrolíticas. Porém não foi capaz de hidrolisar carboidratos, no entanto este isolado indicou a habilidade de hidrolisar caseína, esculina e Tween80. De modo semelhante, DFs843 (*R. fasciens*) hidrolisou amido, esculina e Tween80 (tab.8)

Os demais isolados avaliados DFs513, DFs831 e DFs842 (*P. veronii*, *P. fluorescens*, *P. fluorescens*), destes dois foram capazes de hidrolisar proteases, sendo DFs831 hidrolisou caseína, esculina e gelatina, enquanto que DFs842 apenas esculina e gelatina. Considerando a hidrólise de lipídeos DFs513 indicou ser capaz de hidrolisar lecitina e Tween80, já DFs831 apenas Tween80 e DFs842 lecitina. Para nenhum destes isolados de *Pseudomonas* detectou-se hidrólise de carboidratos (tab.8). De modo geral, considerando todas as atividades hidrolíticas, a que contribuiu com os maiores coeficientes nas avaliações foi a proteolítica.

Considerando a produção de compostos voláteis, especificamente amônia, dos oito isolados testados apenas três não foram capazes de produzir amônia DFs831, DFs843 e DFs912 identificados por *P. fluorescens*, *R. fasciens* (tab.8). Em relação a produção de sideróforos destaque para DFs348 e DFs769 os únicos isolados que indicaram ser agentes quelantes de Fe^{+3} , ambos pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Considerando a produção de antibióticos, nenhum dos isolados avaliados produziu compostos não voláteis e hidrossolúveis efetivos contra *S. sclerotiorum*, a partir do confronto em placas de Petri.

Tabela 8 – Caracterização biológica de isolados biocontroladores de doenças do feijão em função da produção de compostos relacionados ao controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Bactéria	Hidrólise de Carboidratos				Hidrólise de Proteínas			Hidrólise de Lipídeos		Produção de Compostos Antimicrobianos		
	amido ¹	celulose ¹	glucana ²	quitina ²	caseína ¹	esculina ³	gelatina ⁴	lecitina ¹	Tween 80 ²	amônia ⁴	antibiose ²	sideróforos ¹
DFs093	2,532	2,487	-	-	2,510	3	72	1,900	+	48	-	-
DFs348	1,253	1,186	-	-	1,104	2	72	1,256	+	24	-	1,928
DFs513	-	-	-	-	2,112	-	96	2,134	+	24	-	-
DFs769	2,653	2,126	-	-	2,798	2	72	2,165	+	24	-	1,670
DFs831	-	-	-	-	2,450	1	96	-	+	28	-	-
DFs842	-	-	-	-	-	1	72	1,958	-	24	-	-
DFs843	2,687	-	-	-	-	3	-	-	+	-	-	-
DFs912	-	-	-	-	3,204	2	-	-	+	-	-	-
Controle	2,380	1,923	+	+	2,373	2	24	1,51	+	24	NA	+

¹coeficiente entre diâmetro médio do halo e da colônia em centímetros; ²avaliações qualitativas, resultados expressos como positivos (+) ou negativos (-); ³avaliações qualitativas, expressas em intensidade relativa variando entre 1 e 3 ou negativos (-); ⁴avaliações qualitativas, expressas em horas para observação dos resultados positivos ou negativos (-). DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348 - *Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843 - *Rhodococcus fasciens*; DFs912-*Rhodococcus fasciens*.

3.3.1 - DISCUSSÃO

Muitos trabalhos indicam a capacidade de produção de diferentes compostos por importantes agentes de controle biológico, inclusive para patógenos que infectam feijão, como por exemplo, Deshwal (2012) detectou a produção de antibióticos, sideróforos e HCN por isolados de *P. aeruginosa*, compostos capazes de inibir o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*. De modo semelhante, mas com isolados de *B. subtilis*, Jian et al. (2007) observaram inibição da germinação de escleródios e do crescimento micelial do mesmo patógeno, sugerindo estarem envolvidos antibióticos de tipo bacillomycin D, bacilysin, ericin, iturin, mersacidina, mycosubtilin, sublancin, subtilina, subtilosin e surfactina. A produção de sideróforos, quitinases, β -1,3 e 1-4 glucanase, HCN, por isolados de *Bacillus spp.* da rizosfera de feijão também foi descrita por Kumar et al. (2012 a), associando esta capacidade à promoção de crescimento e inibição de diferentes fitopatógenos, inclusive de *S. sclerotiorum*.

Por outro lado, bactérias são capazes de controlar diferentes doenças do feijão quando usadas para microbiolizar sementes vem sendo descritas (ZANATTA et al., 2007; CORRÊA et al., 2008, 2010, 2014). No entanto, pouco se conhece a respeito da capacidade de produção de compostos associados ao biocontrole que estas bactérias possuem. Assim, estudos complementares *in vitro* são importantes pois possibilitam conhecer os prováveis mecanismos de ação dos biocontroladores frente a novos patógenos desafiante (MARIANO et al., 1993; ALAMRI et al., 2012). Neste sentido o presente trabalho mostrou que os isolados estudados apresentam diversificada capacidades de produção de compostos, reafirmando o potencial destes em controlar vários patógenos do feijão, aspecto este observado ao longo dos anos em ensaio *in vivo* (ZANATTA et al., 2007; CORRÊA et al., 2008; 2014).

Observou-se no presente estudo diversidade de compostos produzidos por *Bacillus spp.*, conhecidas por sua capacidade de sintetizar ampla gama de compostos antimicrobianos (PHAE; SHODA, 1991; O'SULLIVAN; O'GARA, 1992;

DOWLING; O'GARA, 1994) e capacidade de formar endósporos, estruturas de resistência que conferem uma vantagem adaptativa para sobrevivência no filoplano podendo resistir à dessecação e à ação de radiação (WHIPPS, 2001; GERHARDSON, 2002; LINDOW; LEVEAU, 2002). Adicionalmente, todas as bactérias avaliadas apresentaram atividades proteolítica e lipolíticas. De um lado, a proteólise tem sido considerada importante no controle biológico de nematoides (SHARON et al., 2001; BIN et al., 2005; KHAN et al., 2005) já que algumas pesquisas associaram a atuação destas enzimas sobre as membranas envoltórias de ovos e da cutícula de formas móveis de diferentes espécies de nematoides (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993; PADGHAM; SIKORA, 2007). De outro lado, atividades lipolíticas, foram também associadas ao controle de fitonematoides (WESTCOTT; KLUEPFEL, 1993).

Quando se consideram patógenos produtores de escleródios, como no caso de *S. sclerotiorum*, que contém na sua composição além de proteínas e lipídeos, alguns carboidratos estruturais (TOURNEAU, 1979), é necessário então observar a importância de outras enzimas líticas. Assim, glucanas e quitina, que são compostos majoritários da parede de fungos (FEIFILOVA, 2010) e, celulose das paredes de oomicetos (ALEXOPOULOS et al., 1996) são alvos estratégicos para a atividade enzimática de microrganismos biocontroladores (ROMEIRO, et al., 2000; DUFFY et al., 2003).

As bactérias avaliadas no presente trabalho apresentaram pouca ou nenhuma atividade lítica de carboidratos, assim sendo, o parasitismo de fungos parece não estar associado ao biocontrole de doenças fúngicas observado por diferentes autores quando usaram estas bactérias para microbiolizar sementes de feijão (ZANATTA et al., 2007; SILVA et al., 2009 b; CORRÊA, et al., 2008, 2014). Por outro lado, atividade celulolítica, observada nos isolados de *Bacillus*, aponta para uma possível atividade biocontroladora de oomicetos, onde estas enzimas atuariam como degradadoras da parede celular (DUNNE et al., 1998). Além disso, a produção de celulasas pode se tornar uma habilidade que confere vantagem competitiva para os biocontroladores quando em solos onde houve a incorporação de resíduos vegetais, uma vez que a celulose é o principal componente destes tecidos (NAKASONE et al., 1999; KATO et al., 2004; BONANOMI et al., 2007). Nestes casos, é possível aventar que os biocontroladores apresentariam maior potencial de sobrevivência.

Considerando-se compostos antimicrobianos, os isolados aqui estudados foram pouco expressivos. Embora a maioria tenha produzido amônia, não foi possível observar antibiose pelo pareamento destes com micélio de *S. sclerotiorum*, não se descartando a possibilidade de produção de antibióticos pelos isolados bacterianos a partir da utilização de outras metodologias, como líquido metabólito ou culturas submersas. Pois a capacidade de produção de compostos pelos isolados bacterianos aqui avaliados já é fato estabelecido, uma vez que, os mesmos foram capazes de inibir o crescimento de outros patógenos do feijão, tais como *F. oxysporum*, *F. solani*, *R. solani*, *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, bem como as bactérias *Curtobacterium flaccumfacens* pv. *flaccumfacens* (CORRÊA, 2010) e *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (SILVA et al., 2008), além do nematoide das galhas *Meloidogyne incognita* (CORRÊA et al., 2012). No entanto, estes autores observaram baixo percentual de biocontroladores efetivos para os diferentes patógenos, e que a inibição do crescimento micelial ou bacteriano variou em função do isolado patogênico.

Adicionalmente, dois isolados de *Bacillus* (DFs348 e DFs769) produziram sideróforos, compostos envolvidos na competição por ferro. O que confere a estas bactérias o potencial de atuar no controle de fitopatógenos através da indução de resistência, ou competição por nutrientes e ou ainda, promoção do crescimento devido à redução de microrganismos deletérios (BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001). Portanto, é possível que a produção destes compostos esteja associada ao biocontrole de patógenos do feijão, em especial à indução de resistência, uma vez que estas bactérias biocontroladoras apresentam amplo espectro de ação, controlando patógenos foliares e caulinares quando distantes do patógeno (CORRÊA et al., 2014), bem como, *S. sclerotiorum* em folhas destacadas de canola (SANGIOGO et al., 2014).

Os isolados aqui estudados foram capazes de produzir diversos compostos associados a diferentes mecanismos de ação do biocontrole de patógenos de plantas. Portanto, é possível aventar que estes compostos potencialmente são produzidos quando na presença da planta hospedeira e desta forma, responsáveis, pelo menos em parte, pelo biocontrole já observado *in planta*. Por fim, estes resultados reafirmam o potencial de uso dos isolados aqui avaliados em programas de controle biológico.

3.4 - CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos avaliados possuem diversidade de produção de compostos associados ao biocontrole de doenças.

Os isolados de *Bacillus cereus* (DFs93, DFs769) e *Bacillus sp.* (DFs348) apresentaram maior diversidade para a produção de compostos associados ao biocontrole do mofo branco.

4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sclerotinia sclerotiorum está entre os mais destrutivos fitopatógenos habitantes de solo que acometem o feijão, sendo um dos principais fatores limitantes de produtividade do grão. A falta de cultivares resistentes de feijão e métodos alternativos eficazes para o controle da doença torna o controle químico o método mais utilizado para o controle da doença, promovendo com o passar dos anos o surgimento de populações resistentes do fitopatógeno, além de aumentar custos de produção. Neste contexto, pesquisas por alternativas com alta eficiência, baixo custo e impacto ambiental limitado é um desafio a ser vencido.

Claramente, a microbiolização de sementes de feijão com isolados bacterianos, com reconhecido potencial de biocontrole para doenças do feijão, indicou ser uma alternativa promissora para o controle de *S. sclerotiorum*. Através dos resultados obtidos nos bioensaios e ensaio *in planta* foi possível identificar que os isolados bacterianos apresentam potencial de uso para controle biológico deste fitopatógeno, pois alguns isolados destacaram-se de modo individualizado, mas também por combinações. Ao mesmo tempo, também foi detectada *in vitro* a produção de importantes compostos pelos quais atuam de modo direto sobre *S. sclerotiorum*, confirmando o amplo espectro de ação e potencial de controle dos isolados bacterianos aqui avaliados. De certo modo as experimentações realizadas neste trabalho indicam um futuro promissor para a utilização dos isolados bacterianos no controle biológico de *S. sclerotiorum*, embora ainda sejam necessários estudos que esclareçam melhor tais potencialidades dos isolados como desenvolvimento de pesquisas à campo. Assim, a investigação destas potencialidades passa a ser prioridade em futuros trabalhos a fim de tornar a microbiolização de sementes com bactérias de modo individualizado ou em combinações um método eficiente e viável.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M. T.; ALI, N. Y.; SULEMAN, P. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. **Crop Protection**, v. 27 p.1354-1359, 2008.

AGROFIT, **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, disponível em http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons: acessado em fevereiro de 2015.

ALAMRI, S.; HASHEM, M.; MOSTAFA, Y. S. *In vitro* and *in vivo* biocontrole of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible modo of action. **Biocontrol Science**, v. 17, n. 4, p. 155-167, 2012.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley, 1996, 869p.

ANACKER, L. F. **Controle biológico do cretamento bacteriano comum e da antracnose em folhas de feijão pela pulverização de bactérias**. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BAHKALI, A.L.; ELSHESHTAWI, M.; MOUSA, R.A.; ELGORBAN, A, M.; ALZARQAA, A. A.Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* in beans with antagonistic microorganisms under greenhouse conditions. **Research on crops**, v. 15, n. 4, p. 884-842, 2014.

BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and development of rust pustules on bean leaves. **Phytopathology**, v. 73, n. 8, p. 1148-1152, 1983.

BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas spp.* **Phytopathology**, v. 97, p. 239-243, 2007.

BAKKER, P.A.H.M.; DOORNBOS, R.F.; ZAMIOUDIS, C.; BERENSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J. Induced systemic resistance and the rhizosphere microbiome. **The Plant Pathology Journal**, v. 29, n. 2, p. 136-143, 2013.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 110-114, 2012.

BARDIN, S. D.; HUANG, H. C. Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in. Canada. **Canadian Journal Plant Pathology**, Ottawa, v. 23, n. 1, p. 88-98, 2001.

BARRA, V. R.; ROMEIRO, R.S.; FERRAZ, H.G.M.; MACAGNAN, D.; SILVA, H. S. A.; MOURA, A. B.; HALFELD-VIEIRA, B. A; MENDONÇA, H. L.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. Potencialidade antagonística em alguns procariotas agentes de biocontrole de enfermidades de plantas. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.2, p.121-126, 2008.

BERRY, C.; DILANTHA FERNANDO, W.G.; LOEWEN, P.C.; KIEVIT T. R. D. Lipopeptides are essential for *Pseudomonas* sp. DF41 biocontrol of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 55, p. 211-218, 2010.

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

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S.M.T.P. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, 333-349p.

BIN, L.; XIE, G.; SOAD, A.; COOSEMANS, J. Suppression of *Meloidogyne javanica* by antagonistic and plant growth-promotion rhizobacteria. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6, p. 496-501, 2005.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, n.4, p.343-350, 2001.

BOER, M.; BOM, P.; KINDT, F.; KEURENTJES, J. J.B.; SLUIS, I.; VAN LOON, L. C. BAKKER, P. A. H. M. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining *Pseudomonas putida* strains that have different disease suppression mechanisms. **Phytopathology**, v.93, n.5, p.626-632, 2003.

BOLAND, G. J.; HALL, R. Index of plant hosts *Sclerotinia sclerotiorum*. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Ottawa, v. 16, n. 7, p. 93-1108, 1994.

BOLTON, M. D.; THOMMA, B. P. H. J.; NELSON, B. D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. **Molecular Plant Pathology**, v. 7, p. 1-16, 2006.

BONANOMI, G.; ANTIGNANI, V.; PANE, C.; SCALA, F. Suppression of soilborne fungal diseases with organic amendments. **Journal of Plant Pathology**, v. 89, n. 3, p.311-334, 2007.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Documentos 139).

CENTURION, M.A.P.C.; KIMATI, H. Biological control of the bean rust with antagonistic bacteria. **Summa Phytopathology**, v. 20, n.3-4, p. 179-183, 1994.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Conab. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf> Acesso em 15 de fevereiro de 2015.

CORRÊA, B. O. **Promoção do crescimento de plantas e controle biológico de doenças em feijão pelo uso de combinações de rizobactérias: mecanismos e ampliação do espectro de ação**. 99 f.Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. RS, 2010.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; LUDWIG, J.; SOARES, V. N. Caracterização biológica de isolados bacterianos biocontroladores de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31 (Suplemento). p.238-238, 2006, (Resumo).

CORRÊA, B. O.; MOURA, A.B.; DENARDIN, N.A.; SOARES, V.N.; SCHÄFER, J.T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p.156-163, 2008.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A.B.; GOMES, C.B.; SOMAVILLA, L.; ROCHA, D.J.A.; ANTUNES, I. F. Potencial da microbiolização de sementes de feijão com rizobactérias para o controle de nematoide das galhas. **Nematropica**, v.42, n.2, 2012.

CORRÊA, B.O.; SCHAFER, J.T.; MOURA, A.B. Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean. **Biological Control**, v.72, p. 71-75, 2014.

CRUZ, C.D. **Programa Genes: biometria**. Viçosa: Editora UFV. 2006 a, 38p.

CRUZ, C.D.; CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético. 2. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006 b.

DE FIGUEIRÊDO, G. S.; DE FIGUEIRÊDO, L. C.; FRANCINETE, C. N.; CAVALCANTI, M.; SANTOS, A. C.; COSTA, A.; OLIVEIRA, N. T. Biological and chemical control of *Sclerotinia sclerotiorum* using *Trichoderma spp.* and *Ulocladium atrum* and pathogenicity to bean plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 1, p. 1-9, 2010.

DESHWAL, V.K. *Pseudomonas aeruginosa* as biological control agent against plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences**, v. 2, n. 1, p. 14-17, 2012.

DHINGRA, O. D.; SINCLAIR, J. B. **Basic plant pathology methods**. 2ed. Flórida: Life Sciences and Medicine Research, 1995, 434p.

DIAS, A.; PACHECO, R.S.; SANTOS, S.G.; XAVIER, G.R.; RUMJANER, N.G.; RIBEIRO, R.L.D. Screening of fluorescent rizobactéria for the biocontrol of soilborne plant pathogenic fungi. **Revista caatinga**, v. 27, n. 2, p. 1-9, 2014.

DOMENECH, J.; REDDY, M.S.; KLOPPER, J.W.; RAMOS, B.; MAÑERO GUITERREZ, J. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus*, *Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato. **Biologic control**, v. 51, p. 245-258, 2006.

DOWLING, D.N.; O'GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Tibtech reviews**, v.12, p.133-141, 1994.

DUFFY, B., SCHOUTEN, A., RAAIJAMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 501- 538, 2003.

DUFFY, B.K.; SIMON, A.; WELLER, D.M. Combination of *Thicorderma Koningii* with *Pseudomonas fluorescens* for control of take-all on wheat. **Phytopathology**, v. 86, p. 188-194, 1996.

DUFFY, B.K.; WELLER, D.M. Use of *Gaeumannomyces graminis* var. alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas spp.* to supress take-all of wheat. **Plant Disease**, v. 79, p. 907-911, 1995.

DUNNE, C.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; MC CARTHY, J.; HIGGINS, P.; POWELL, J.; DOWLING, D. Combining proteolytic and phloroglucinos- producing bactéria for improved biocontrole of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. **Plant Pathology**, v. 47, p. 299-307, 1998.

EARL, A. M.; LOSICK, R.; KOLTER, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. **Trends Microbiology**, v. 16, p. 269-275, 2008.

ELAD, Y.; KOHL, J.; FOKKEMA, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. **Phytopathology**, v. 84, p. 1193, 1994.

FAHY, P.C.; PERSLEY, G.J. **Plant bacterial diseases**. Academic Press Australia, 1983, 393p.

FEIFILOVA, E.P. The fungal cell wall: modern concepts of its composition and biological function. **Microbiology**, v. 79, n.6, p. 711-750, 2010.

FERNANDO, W.G.D.; NAKKEERAN, S.; ZHANG, Y.; SAVCHUK, S. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. **Crop Protection**, v. 26, p. 100-107, 2007.

FUKUI, R.; SCHROTH, M.N.; HENDSON, M.; HANCOCK, J.G. Interaction Between strains of *Pseudomonas* in sugar beet spermospheres and their relation ship to pericarp colonization by *Phythium ultimum* in soil. **Phytopathology**, v. 84, p. 1322-1330, 1994.

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; DINOOR, A. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. **Phytopathology**, v. 91, n. 7, p.621-627, 2001.

GUETSKY, R.; STIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. Improving Biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, v. 92, p. 976-85, 2002.

HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 307-319, 2005.

HANNUSCH, D.J.; BOLAND, G.J. Influence of air temperature and relative humidity on biological control of White mold of bean (*Sclerotinia sclerotiorum*). **Phytopathology**, v. 86, p. 156-162, 1996.

HERNÁNDEZ-LEÓN R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M.D.C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; REYES, H.C.L; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v.81, p.83-92, 2015.

HUANG, H.C.; BREMER, E.; HYNES, R.K.; ERICKSON, R.S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold by dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 18, p. 270-276, 2000.

ILLIPRONTI JR, R.A.; MACHADO, J.C. Antagonismo de fungos a *Sclerotinia sclerotiorum* em soja e feijão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 18, p.162-166, 1993.

JI, S. H.; PAUL, N. C.; DENG, J. X.; KIM, Y. S.; YUN, B. S.; YU, S. H. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, v. 41, n. 4, p. 234-242, 2013.

JIANG, M.; ZHAO, R.; HU, X.; ZHANG, Y.; WANG, G. Colonization by the antifungal bacterium BY-2 and control of disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Acta Phytopathologica**, v. 37, p. 192-196, 2007.

KADO, C.I.; HESKETT, M.S. Seletive media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytophathology**, v.60, p.969-976, 1970.

KASANA, R.C.; SALWAN, R.; DHAR, H.; DUTT, S.; GULATI, A. A rapid and easy method for detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, v. 57, p. 503-507, 2008.

KATO, S; HARUTA, S; CUI, Z; ISHII, M; IGARASHI, Y. Effective cellulose degradation by a mixed-culture system composed of a cellulolytic *Clostridium* and aerobic non-cellulolytic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 133-142, 2004.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecolomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Melodogyne javanica* juveniles. **Biologic control**, v. 31, p. 346-352, 2005.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th International conference on plant pathogenic bacteria, vol. 2. **Station de Pathologie Vegetale et de Phytobacteriologie**, INRA, Angers, France, p. 879-882, 1978.

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

KUMAR, A.; SAINI, S.; WRAY, V.; NIMTZ, M.; PRAKASH, A.; JOHRI, B.N. Characterization of on antifungal compound produced by *Bacillus* sp. strain A₅F that inhibits *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of basic microbiology**, v. 52, p. 670-678, 2012 b.

KUMAR, B.S.D.; DUBE, H.C. Seed bacterization with a fluoresente *Pseudomonas* for enhanced plant growt, yield and disease control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 539-542, 1992.

KUMAR, P.; DUBEY, R.C.; MAHESHWARI, D.K. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. **Microbiological Research**, v.167, p. 493-499, 2012 c.

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

LATHA, P.; ANAND, T.; PRAKASAM, V.; JONATHAN, E.I.; PARAMATHMA M.; SAMIYAPPAN, R. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. **Applied Soil Ecology**, v. 49, p. 215-223, 2011.

LEEMAN, M.; OUDEN, F. M. D.; PELT, J. A. V.; DIRKX, F. P. M.; STEIJL, H.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. **Phytopathology**, v. 86, p. 149-155, 1996.

LI, G.Q.; HUANG, H.C.; ACHARYA, S.N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 28, p.11-18, 2003.

LI, H.; LI, H.; BAI, Y.; WANG, J.; NIE, H.; LI, B.; XIAO, M.; The use of *Pseudomonas fluorescens* P13 to control stem rot *Sclerotinia sclerotiorum* of oilseed rape. **Journal Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 884-889, 2011.

LI, H.; ZHOU, M. Rapid identification of carbendazin resistant strains of *Sclerotinia sclerotiorum* using allele-specific oligonucleotide (ASO)-PCR. **Scientia Agricultura Sinica**, Beijing, v. 37, n. 9, p. 1396-1399, 2004.

LIBERATO, J.R., CRUZ, C.D., VALE, F.X.R., ZAMBOLIM, L. Técnicas estatísticas de análise multivariada aplicada à fitopatologia. I. Análise de componentes principais, análise canônica e “cluster análise”. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.3, p.227-281, 1995.

LOEWEN, P. C.; SWITALA, J.; FERNANDO, W. G. D.; DE KIEVIT, T. Genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* DF41. **Genome Announcements**, v. 2, n. 3, p.14, 2014.

MAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Perfil do feijão no Brasil. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais> Acesso em: 10 de fevereiro de 2015.

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

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2 ed. Recife: UFRP, 2005,184p.

MEDEROS, Y. Revisión bibliográfica: indicadores de la calidad en el grano de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). **Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas**, v. n. 27, p. 55-62, 2013.

MELO, I.S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos**. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Eds.) Controle biológico. Jaguariúna. EMBRAPA. 1998,17-66p.

MENENDEZ, A.B.; GODEAS, A. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* attacking soybean plants. Degradation of the cell walls of this pathogen by *Trichoderma harzianum* (BAFC 742). **Mycopathologia**, v. 142, p. 153-160, 1998.

MIZUBUTI, E.S.G.; MAFFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J.J.; ROMEIRO, R.S.; BATISTA, U.G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 540-544, 1995.

MOHAMED, H.A.L.A.; HAGGAG, W.M. Biocontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. **Journal Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 181-191, 2006.

MUELLER, D. S.; DERKSEN, R. C.; OZKAN, E. Efficacy of fungicides on *Sclerotinia sclerotiorum* and their potential for control of *Sclerotinia* stem rot on soybean. **Plant Disease**, v. 86, n. 1, p. 26-31, 2002.

NAKASONE, A.K.; BETTIOL, W.; SOUZA, M. Efeito de extratos aquosos de matéria orgânica sobre fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v.25, n. 4, p. 330-335, 1999.

OLIVEIRA, M.B.; BARBOSA, S.C.; PETROFEZA, S. Comparative *in vitro* and *in planta* analyses of extracellular enzymes secreted by the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n. 2, p. 1796-1807, 2013.

PADGHAM, J.L.; SIKORA, J.L. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, v.26, p.971-977, 2007.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; LOBO JÚNIOR, M.; MORANDI, M. A. B.; CARNEIRO, J. E. S.; ZAMBOLIM, L. **Manejo integrado do mofo-branco do feijoeiro**. Viçosa: Epamig, 2006. 48p.

PAULA JÚNIOR, T. J.; VIEIRA, R. F.; ROCHA, P. R. R.; BERNARDES, A.; COSTA, E. L.; CARNEIRO, J. E. S.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. White mold intensity on common bean in response to plant density, irrigation frequency, grass mulching, *Trichoderma* spp., and fungicide. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.44-48, 2009.

PAULA JÚNIOR, T.J.; TEIXEIRA, H.; VIEIRA, R.F.; MORANDI, M.A.B.; LEHNER, M.S.; LIMA, R.C.; CARNEIRO, J.E.S. Limitations in controlling white mold on common beans with *Trichoderma* spp. at the fall-winter season. **Summa Phytopathologica**, v.38, n.4, p.337-340, 2012.

PETZOLDT, R.; DICKSON, M. H. Straw test for resistance to white mold in beans. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 39, p. 142-143, 1996.

PIERSON, E.A.; WELLER, D.M. Use of mixtures of fluorescent *pseudomonas* to suppress take-all and improve the growth of wheat. **Phytopathology**, v. 84, p. 940-947, 1994.

PIETERSEN, C.M.J.; WEES VAN, S.C.M.; TON, J. PELT VAN, J.A.; LOON VAN, L.C. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Biological**, v. 4, p. 535-544, 2002.

REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R.; DANELLI, A.D.; CASA, R.T. Ciclo do mofo branco. **Revista Plantio Direto**, v. 122, p. 24-27, 2011.

REMUSKA, A.C.; PRIA, D. M. Efeito de *Bacillus thuringiensis* e *Trichoderma* sp. no crescimento de fungos fitopatogênicos. **Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 13, n. 3, p. 31-36, 2007.

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

ROMEIRO, R.S.; NEVES, D. M. S. CARVALHO, M. G.; CARRER-FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 220-224, 2000.

SANGIOGO, M.; BERMUDEZ, J. M. M.; RODRIGUEZ, D.P.; BARBOZA, L.F.; MOCELLIN, R. Avaliação da indução de resistência por bactérias promotoras do crescimento de plantas a *Sclerotinia sclerotiorum* em folhas de canola. (Resumo): **VII Reunião Brasileira de Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Maringá, 2014.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria**. 3 ed. Saint Paul: The American Phytopathology Society, 2001, 373 p.

SCHWARTZ, H. F.; HARVESON, R. M.; STEADMAN, J. R. White mold of dry beans. Published by University of Nebraska-Lincoln Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, 2012. Disponível em: <http://www.ext.colostate.edu/pubs/crops/02918.pdf>. Acesso em: 23 de janeiro 2015.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Annual Biochemical**, v.190, p.47-56, 1987.

SENTHILKUMAR, M.; SWARNLAKSHMI, K.; GOVINDASAMY, V.; LEE Y, K.; ANNAPURNA, K. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus *Rhizoctonia bataticola*. **Current Microbiology**, v. 58, p. 288-93, 2009.

SHARON, E.; BAR-EYAL, M.; CHET, I.; HERRERA-ESTRELLA, A.A.; KLEIFELD, O.; SPIEGEL, Y. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v.91, p.687-693, 2001.

SILVA, A. G.; ROCHA, L. C.; BRAZACA, S. G. C. Caracterização físico-química, digestibilidade proteica e atividade antioxidante de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Alimentos Nutrição**, Araraquara, v.20, n.4, p. 591-598, 2009 a.

SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; CARDOSO, C. D.; FARIAS, D. R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v. 55, n. 5, p. 377-383, 2008.

SILVA, E.G.; MOURA, A.B.; BACARIN, M.A.; DEUNER, C.C. Alterações metabólicas em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas por *Pseudomonas* sp. e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.98-104, 2009 b.

STEADMAN, J. R. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, p. 904-907, 1979.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845-857, 2005.

SUN, P.; YANG, X.B. Light, temperature, and moisture effects on apothecium production of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Disease**, v. 84, p. 1287-1293, 2000.

TAYAL, P.; KAPOOR, R.; BHATNAGAR, A.K. Functional synergism among *Glomus fasciculatum*, *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* on *Fusarium* wilt in tomato. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, n. 3, p. 745-750, 2011.

THOMASHOW, L. S.; WELLER, D.M. **Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control**: mechanisms and antifungal metabolites. In: STACEY, G.; KEEN, N. Plant-Microbe Interactions, Vol. 1. ed. Chapman & Hall, New York. 1995, 187-235p.

TOURNEAU, D. L. Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* species in culture. **Phytopathology**, v. 69, p. 887, 1979.

VIEIRA, R. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa: UFV.1988, 231p.

WELLER, D. M.; THOMASHOW, L. S. **Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere**. In: O'GARA, F., DOWLING, D. N., BOESTEN, B. Molecular ecology of rhizosphere microorganisms, 1994, 67-89p.

WENTING, Z.; DECHUN, W.; WILLIAM, K.; JIANJUN, H. Use of *Coniothyrium minitans* and other microorganisms for reducing *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biologic Control**, v. 60, p. 225-32, 2012.

WESTCOTT, S.W.; KLUEPFEL, D. Inhibition of *Cricodemella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. **Phytopathology**, v.83, p.1245-1249, 1993.

WU, Y.; YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n.10, p. 1327-1336, 2014.

XU, Z.; SHAO, J.; LI, B.; YAN, X.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Contribution of bacillomycin Din *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 79, p. 808-815, 2013.

YANG, D.J.; WANG, B.; WANG, J. X.; CHEN, Y.; ZHOU, M. G. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *sclerotinia* stem rot of rape. **Biologic Control**, v. 51, p. 61-65, 2009.

YASMIN, H.; BANO, A.; NAZ, R.; FAROOQ, U.; NOSHEEN, A.; FAHAD, S. Growth promotion by P-solubilizing, siderophore and bacteriocin producing rhizobacteria in *Zea mays* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 3, p. 553-559, 2012.

YU, G.; SINCLAIR, J.; HARTMAN, G.; BERTAGNOLLI, B. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology Biochemistry**, v. 34, p. 955-963, 2002.

YU, X.; AI, C.; XIN, L.; ZHOU, G. The siderophore producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 138-145, 2010.

YUEN, G.; GODDOY, G.; STEADMAN, J.; KERR, E.; CRAIG, M. Epiphytic colonization of dry edible bean by bacteria antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* and potential for biological control of white mold disease. **Biologic Control**, v.1, p. 293-301, 1991.

ZANATTA, Z. G. C. N. **Potencial de bactérias para biocontrole de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***. 2004. 67f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) - Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

ZANATTA, Z.G. C; MOURA, A. B; MAIA L. C.; SANTOS A.S. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 511-515, 2007.

ZHANG, J.X.; XUE, A. G. Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of soybean using novel *Bacillus subtilis* strain SB24 under control conditions. **Plant Pathology**, v. 59, p. 382-391, 2010.