

**MÁRIO CÉSAR GOMES LADEIRA**

**BIOCONTROLE DE *Quambalaria eucalypti* POR MEIO DE  
RIZOBACTÉRIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Science”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2004

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L154b  
2004

Ladeira, Mário César Gomes, 1977-

Biocontrole de *Quambalaria eucalypti*, por meio de rizobactérias / Mário César Gomes Ladeira. – Viçosa : UFV, 2004.

ix, 34 : il. ; 29cm.

Orientador: Acelino Couto Alfenas.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Pragas - Controle biológico.  
2. *Quambalaria eucalypti* - Controle biológico. 3. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. 4. Eucalipto - Doenças e pragas - Controle. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 20.ed. 632.96

**MÁRIO CÉSAR GOMES LADEIRA**

**BIOCONTROLE DE *Quambalaria eucalypti* POR MEIO DE  
RIZOBACTÉRIAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Science”.

APROVADA: 19 de março de 2004.

---

Prof. Luiz Antônio Maffia  
(Conselheiro)

---

Prof. Robert Weingart Barreto  
(Conselheiro)

---

Prof. Silvaldo Felipe da Silveira

---

Dr. Hudson Teixeira

---

Prof. Acelino Couto Alfenas  
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais Mário Ladeira e Maria das Graças.

Aos meus irmãos Carlos e Débora.

À minha noiva Elis.

## AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado.

Ao professor Acelino Couto Alfenas, pelos ensinamentos, pela orientação e pela confiança.

Aos professores Luiz Antônio Maffia, Robert Weingart Barreto, Silvaldo Felipe da Silveira e ao Dr. Hudson Teixeira, por terem acreditado no meu trabalho, pela colaboração, pelas críticas e pelas sugestões.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Florestal, pelo convívio e pela colaboração, em especial à Márcia, Sandra, ao Edival, Aderlan, Alex e Eneir.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela atenção e pela colaboração, em especial ao Renildo.

À Elis, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo carinho, pela paciência e pela compreensão. Sem ela, tudo seria mais difícil.

Aos meus familiares, em especial ao meu pai Mário Antônio Ladeira, pelo apoio.

Aos meus colegas da turma de mestrado 2002, em especial aos companheiro de república, Bruno, Everaldo e Vinícius, pela amizade, pelo apoio e pelos momentos de alegria vividos.

À “tia Nilda”, pelo carinho, pela dedicação demonstrada em nossa república, pelas brincadeiras e também pelas broncas.

A todos que acreditaram neste trabalho e que contribuíram, de alguma maneira, para sua realização.

## **BIOGRAFIA**

MÁRIO CÉSAR GOMES LADEIRA, filho de Mário Antônio Ladeira e Maria das Graças Gomes Ladeira, nasceu em 17 de fevereiro de 1977 em Coronel Fabriciano, Minas Gerais. Em julho de 1994, mudou-se para a cidade de Cajuri, no mesmo Estado.

Concluiu o curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa em agosto de 2001, iniciando, no mesmo ano, trabalhos como bolsista de aperfeiçoamento no Projeto Rizolyptus®.

Em março de 2002, ingressou no curso de Mestrado em Fitopatologia na mesma Universidade, sob orientação do professor Acelino Couto Alfenas.

## ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	6
BIOCONTROLE DE <i>Quambalaria eucalypti</i> POR MEIO DE RIZOBACTÉRIAS	9
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS .....	20
DISCUSSÃO.....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
CONCLUSÕES GERAIS.....	34

## RESUMO

LADEIRA, Mário César Gomes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, março de 2004.  
**Biocontrole de *Quambalaria eucalypti* por meio de rizobactérias.** Orientador:  
Acelino Couto Alfenas. Conselheiros: Luiz Antônio Maffia e Robert Weingart  
Barreto.

Atualmente, a maior parte da produção de mudas de *Eucalyptus* spp. é realizada via propagação vegetativa, por miniestaquia. Neste sistema, o adensamento das minicepas e o regime intensivo de coleta de brotos para estaquia favorecem a incidência de doenças. Dentre estas, destaca-se o anelamento da haste e a mancha foliar, causado por *Quambalaria eucalypti*. O controle biológico de doenças de plantas, incluindo o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de planta (PGPR), comporta-se como uma alternativa promissora para o controle integrado de fitomoléstias em várias culturas, incluindo doenças em viveiros clonais de eucalipto. Assim, neste trabalho, avaliou-se o potencial de 11 isolados de rizobactérias indutoras de enraizamento e crescimento de mudas de eucalipto quanto ao antagonismo e a sensibilidade *in vitro* a fungicidas, e seu potencial no controle de *Q. eucalypti*. Todos os isolados testados inibiram significativamente o crescimento micelial *in vitro* do fungo, seja por antibiose direta ou produção de compostos antifúngicos voláteis. Na avaliação da inibição da germinação de conídios destacaram-se os isolados FL<sub>2</sub>, MF<sub>2</sub> e Ca, que não diferiram de tebuconazole, usado como comparador. O ensaio de sensibilidade de rizobactérias a fungicidas indicou que a maior parte das combinações de rizobactérias e fungicidas testados foram compatíveis. Em condições de casa de vegetação, todos os

isolados reduziram a severidade da doença quando pulverizados a 48 h, simultaneamente e 48 h após a inoculação do patógeno. Menor severidade da doença foi observada com aplicação dos isolados FL<sub>2</sub> e 3918 a 48 h, e FL<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> aplicados simultaneamente com o patógeno. A pulverização de suspensão dos isolados S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, 3918 e FL<sub>2</sub> em minicepas clonais proporcionou redução significativa da doença em folhas e hastes. A aplicação das rizobactérias no substrato de enraizamento propiciou redução na severidade da doença em relação à testemunha, sendo FL<sub>2</sub> o isolado mais efetivo. Os resultados deste trabalho permitem concluir que os isolados de rizobactérias testados apresentam potencial de uso em um sistema de manejo integrado para o controle da doença.

## ABSTRACT

LADEIRA, Mário César Gomes, M.S., Universidade Federal de Viçosa, March 2004.  
**Biocontrol of *Quambalaria eucalypti* by rhizobacteria.** Advisor: Acelino Couto Alfenas. Committee members: Luiz Antônio Maffia and Robert Weingart Barreto.

Nowadays, eucalyptus cutting production is made mostly by vegetative propagation of mini-cuttings. In this system, the small spacing of mini-stumps and the intense shoot harvesting for cutting favors the incidence of diseases, as the stem girdling and leaf spot caused by *Quambalaria eucalypti*. In the biological control of plant diseases the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) is a promising alternative to the integrated disease management in various crops, including diseases in the clonal nurseries of eucalyptus. Thus, in this work, the potential of 11 isolates of rhizobacteria that induce rooting and seedling growth of eucalyptus was evaluated for *in vitro* antagonism to the pathogen, sensitivity to some fungicides, and for their potential for the biological control of *Q. eucalypti*. All tested isolates significantly inhibited the mycelial growth by direct antibiosis or by producing antifungal volatile compounds. Similarly to tebuconazol, the isolates FL2, MF2 and Ca were effective to inhibit conidial gemination. The fungicide sensitive test indicated that most of the rhizobacteria-fungicide combinations were compatible. In the greenhouse tests, all isolates tested reduced the disease when sprayed at 48 h, simultaneously or 48 h after inoculation of cuttings with the pathogen. The lowest disease severity was observed with isolates FL2 and 3918 applied at 48 hours, and FL2 and RC3 applied simultaneously with the pathogen. Spraying of suspension of isolates S1, S2, 3918 and

FL2 in mini-clonal hedges significantly reduced disease incidence on leaves and stems. Application of rhizobacteria to the rooting substrate reduced the disease, being the FL2 isolate the most effective. The results of this work allow concluding that the isolates of rhizobacteria tested have the potential to be used in an integrated management system for the control of the stem girdling and leaf spots of eucalyptus caused by *Q. eucalypti*.

## INTRODUÇÃO GERAL

O eucalipto é a essência florestal mais plantada no Brasil, ocupando uma área de, aproximadamente, três milhões de hectares, destinados principalmente à produção de matéria prima vegetal para celulose, carvão, madeira para serraria, postes de eletricidade, mourões de cerca, óleos essenciais, construção civil, entre outros. A produção de mudas de eucalipto é realizada, principalmente, via propagação vegetativa, por miniestaquia, o que proporciona a formação de talhões homogêneos, de genótipos selecionados com base no alto rendimento de celulose e resistentes a doenças (Alfenas *et al.*, 2004). A miniestaquia é altamente vantajosa em relação à estaquia convencional face ao aumento do rendimento operacional, maior grau de juvenilidade e porcentagem de enraizamento das miniestacas, maior velocidade de enraizamento e, conseqüentemente, menor exposição das estacas aos fungos apodrecedores. Sua utilização também diminui ou elimina o uso de hormônios de enraizamento e possibilita o estabelecimento de minijardins clonais em canteiros suspensos e cobertos (Assis, 1997). Porém, o adensamento das minicepas e a produção e coleta intensiva de brotos para estaquia favorecem o desenvolvimento de alguns fitopatógenos, como *Cylindrocladium* sp., *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Oidium eucalypti* Rostr, *Puccinia psidii* Winter e *Quambalaria eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson, sendo o último um dos principais patógenos que incidem em minicepas clonais destinadas à produção de propágulos de enraizamento.

*Quambalaria eucalypti* foi descrito pela primeira vez na África do Sul no início dos anos 90 (Wingfield *et al.*, 1993). No final de 2000, o fungo foi constatado no

Sul do Brasil em minicepas e mudas seminais de *Eucalyptus globulus* Labill, *E. maedenii* Fmuell e seus híbridos. Atualmente, este fungo é encontrado em praticamente todo o território nacional. O patógeno causa o anelamento de haste de mudas e minicepas, podendo incidir também em miniestacas na fase inicial de enraizamento. Nas folhas, as lesões vão do marrom ao marrom escuro, às vezes de contorno arroxeados e de formato variável. Na face inferior do limbo foliar e sobre os demais órgãos afetados, forma-se uma massa pulverulenta de esporulação branca e seca do patógeno (Alfenas *et al.*, 2001).

A ausência de fungicidas registrados para a cultura do eucalipto faz com que outras alternativas de controle de doenças sejam estudadas, incluindo o uso de agentes de controle biológico (Blum & Lin, 1991; Bettiol *et al.*, 1998). Teixeira (2001) obteve 11 isolados de rizobactérias, que proporcionaram maior desenvolvimento do sistema radicular de diferentes genótipos de eucalipto. Segundo a autora, além de terem promovido o enraizamento de estacas e o crescimento de plantas, estas rizobactérias também induziram resistência em mudas à ferrugem (*Puccinia psidii*).

Segundo Schroth & Hancock (1981), rizobactérias que exercem efeito benéfico, apresentando efeito positivo no crescimento de raízes e parte aérea e na resistência de doenças em plantas, são chamadas PGPR (“plant growth promoting rhizobacteria”), podendo, às vezes, ter ação deletéria ou nula sobre a planta (Kloepper *et al.*, 1992; Kloepper, 1996). Dentre as PGPR, destacam-se as dos gêneros *Pseudomonas*, principalmente espécies do grupo fluorescente, *Bacillus* e actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Contudo, outros gêneros de bactérias são citados, como *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Serratia* e *Erwinia* (Mahafee & Kloepper, 1994; Luz, 1996). Embora na área agrônômica os estudos sobre as PGPR já sejam numerosos, na área florestal há poucos relatos sobre o assunto (Bettiol *et al.*, 1998). A atuação das PGPR como agentes de biocontrole favorece indiretamente o desenvolvimento da planta hospedeira. Os principais mecanismos envolvidos no controle de patógenos por PGPR são: a produção de antibióticos, competição, produção de compostos voláteis tóxicos e indução de resistência (Lo, 1998).

O mecanismo de biocontrole mais estudado é a antibiose, principalmente pela facilidade de seu estudo *in vitro*. Porém, a determinação do papel real desse mecanismo *in vivo* tem se mostrado bem mais complexo, pois atua sem repetibilidade no tempo e no espaço, sendo dependente de condições de ambiente favoráveis para ativação e expressão dos genes envolvidos em sua síntese (Loper *et al.*, 1997). Culturas de

*Pseudomonas fluorescens*, isoladas de raízes de macieira, atuaram por antibiose *in vitro* a *Fusarium oxysporum* Schlecht, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Pythium* spp. e *Rhizoctonia solani*. O tratamento de plântulas e cepas de macieira, com alguns isolados desta bactéria, proporcionou aumento no crescimento das plantas, e redução da colonização das raízes, principalmente por *Cylindrocarpon destructans* Zins (Caesar & Burr, 1987).

Diversos grupos de antibióticos produzidos por bactérias são bem conhecidos, como a  $\beta$ -lactam, agrocina 84, oomicinas, bacilomicina, Oomycina A, fenazinas, pioluterinas e pirolnitrinas. Aparentemente, a produção de antibióticos não é espécie-específica. Diferentes espécies podem produzir o mesmo antibiótico ou metabólitos secundários, enquanto diferentes linhagens da mesma espécie podem produzir diferentes antibióticos ou substâncias tóxicas (Lo, 1998).

Compostos voláteis são produzidos por algumas rizobactérias com ação no controle biológico de doenças, sendo a amônia e o ácido cianídrico (HCN) os mais importantes (Weller, 1988; Pal *et al.*, 2000). A produção de HCN pelas rizobactérias mostra-se um fenômeno muito comum. Segundo Défago *et al.* (1990) e Stutz *et al.* (1986), vários isolados de *Pseudomonas* produzem HCN na rizosfera, inibindo o crescimento de vários organismos, como observado no sistema *P. fluorescens* x *Thielaviopsis* sp. em *Nicotiana tabacum* L.. Em batata, foi observado que altas concentrações desse ácido podem ser tóxicas, apresentando efeito deletério sobre o crescimento das mesmas (Shippers *et al.*, 1991). Contudo, outros trabalhos mostram o papel desse composto na promoção do desenvolvimento de pêlos radiculares (Luz, 1996).

Sabe-se que as PGPR produzem metabólitos que agem diretamente sobre o patógeno, tais como antibióticos, enzimas que degradam parede celular, sideróforos e compostos voláteis. Entretanto, há casos em que a separação espacial entre o antagonista e o patógeno indica a ocorrência de um outro mecanismo de biocontrole (Kloepper *et al.*, 1997).

Os mecanismos de defesa de plantas ocorrem naturalmente como resultado da infecção por patógenos, particularmente quando se observa reação de hipersensibilidade, ou podem ser ativados por produtos químicos, organismos não patogênicos, formas avirulentas e, ou, virulentas do patógeno, e por raças incompatíveis de um patógeno. Geralmente, essa indução de resistência é sistêmica e seu efeito pode ser observado em locais da planta distantes do local de aplicação do indutor. Às vezes

ocorre de forma localizada, quando somente o tecido exposto à infecção primária torna-se mais resistente. Denomina-se de resistência sistêmica adquirida (SAR), quando é ativada por patógenos ou ativadores químicos, sendo caracterizada pelo acúmulo de ácido salicílico (SA) e proteínas relacionadas à patogênese (PR's) (van Loon *et al.*, 1998; Romeiro, 2000). Resistência sistêmica induzida (ISR) (Kloepper *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2003), por sua vez, é especificamente induzida por microrganismos não-patogênicos, e a planta que sofreu a indução não exhibe alterações. Ao contrário do observado para SAR, na ISR não ocorre o acúmulo de proteínas PR's e a indução não é salicilato dependente. Entretanto, existem relatos que mostram que a ISR, em alguns casos, pode ser, não só fenotipicamente, mas também mecanicamente idêntica a SAR, levando a um acúmulo de proteínas PR's e sendo salicilato dependente. Como determinantes bacterianos de ISR que podem funcionar como elicitores, podemos destacar os lipopolissacarídeos, presentes na membrana (LPS), sideróforos e o ácido salicílico (van Loon *et al.*, 1998).

Alguns critérios, como a ausência de efeitos tóxicos diretos do organismo de biocontrole sobre o patógeno, a resistência observada ser inibida por aplicação prévia de inibidores específicos da expressão gênica na planta, a necessidade de um intervalo de tempo entre a aplicação e a expressão de resistência pela planta, a ausência da relação entre resistência e dose do indutor, a inespecificidade de proteção, a ocorrência local e sistêmica, e a dependência do genótipo da planta e seu nível de resistência, caracterizam o envolvimento de resistência sistêmica como mecanismo de redução de doença, tanto para ISR, quanto para SAR (Steiner & Schonbeck, 1995). Entretanto, estudos demonstraram a associação, em alguns casos, de efeito antagonístico ao patógeno, associado à indução de resistência no hospedeiro (Silva *et al.*, 1988). *Bacillus thuringiensis*, *Sacharomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis*, além de terem atuado como indutores de resistência, apresentaram um efeito antagonista, provavelmente por antibiose, inibindo a germinação dos uredíniosporos de *Hemileia vastatrix* Berk and Br. em cafeeiro, possibilitando o controle da ferrugem por meio de dois mecanismos consecutivos (Roveratti *et al.*, 1987; Bettiol *et al.*, 1989).

Diante do sucesso do uso de bactérias no controle de doenças, pode-se encontrar no mercado, principalmente norte-americano, formulações de PGPR, como, por exemplo, os produtos Dagger G, à base de *Pseudomonas fluorescens*, Blue Circle, à base de *P. cepacia* e Kodiak, à base de *Bacillus subtilis*, usados no controle de tombamento de mudas em diversas culturas (Turner & Backman, 1991; Luz, 1996). A

compatibilidade entre produtos químicos e agentes de controle biológico é um aspecto importante a se considerar para o manejo integrado de doenças de plantas. O produto Kodiak, por exemplo, é compatível com vários fungicidas, como metalaxyl, thiram, carboxin, captan e PCNB. O uso de linhagens de PGPR, compatíveis em mistura e com diferentes mecanismos de supressão de doença, é uma outra possibilidade no manejo e na aplicação destes organismos (Raupach & Kloepper, 1998). Segundo os autores, a mistura de *B. pulilus* INR7, *Curtobacterium flaccumfaciens* ME1 e *B. subtilis* GBO3, pode substituir o controle químico na produção de pepino no campo, controlando a antracnose, a mancha angular e a murcha bacteriana (*Erwinia tracheiphila* Smith), havendo tendência de maior controle quando misturas de PGPRs foram utilizadas.

Teixeira (2001) obteve 107 isolados de bactérias, obtidos da rizosfera de mudas de diferentes clones de eucalipto, testando-os quanto ao potencial em promover o enraizamento de estacas de *Eucalyptus*. Dez isolados destacaram-se como excelentes indutores, propiciando ganhos de até 110% no enraizamento médio e de até 250% no peso de raiz. Esses isolados foram também testados quanto à capacidade de indução de resistência a doenças em mudas de eucalipto. Dois isolados foram bastante eficientes na redução da severidade de *Puccinia psidii*. Com o tratamento das mudas com rizobactérias apenas uma semana antes da inoculação com *Puccinia psidii*, obteve-se redução na severidade da doença maior do que a observada nas mudas enraizadas em substrato não-tratado com as rizobactérias.

Desta forma, este trabalho avaliou o potencial de isolados de rizobactérias, pré-selecionados quanto à sua capacidade de indução de enraizamento em mini-estacas clonais de eucalipto, como agentes de biocontrole de *Quambalaria eucalypti*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., ROSA, O.P.P., ASSIS, T.F. *Sporothrix eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.2, p.221. 2001.
- ALFENAS, A.C., ZAUZA, E.A.V., MAFIA, R.G., ASSIS, T.F. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: Ed. UFV, 2004. 442p.
- ASSIS, T.F. **Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia**. Conferência IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de eucaliptos. 1997. p.300-304.
- BETTIOL, W., AUER, C. G., CAMARGO, L.E. A., KIMATI, H. Controle da mancha foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium scoparium* com *Bacillus* sp. **Summa Phytopathologica**, v.14, p.210-218. 1998.
- BETTIOL, W., GALVÃO, A.H., GHINI, R., MENDES, M.D.L. Efeito de *Bacillus subtilis* sobre a ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix*). **Summa Phytopathologica**, v.15, p.43. 1989.
- BLUM, L.E.B., LIN, M.T. Potencial de *Trichoderma* e *Pseudomonas* fluorescentes para o controle de tombamento de mudas de eucalipto causado por *Cylindrocladium* spp. **Fitopatologia Brasileira**, v.16, p.71-74. 1991.
- CAESAR, A.J., BURR, T.J. Growth promotion of apple seedlings and rootstocks by specific strains of bacteria. **Phytopathology**, v.77, p.1583-1588. 1987
- DÉFAGO, G., BERLING, C.H., BURGER, U, HAAS, D., KAHR, G., KEEL, C., VOISARD, C., WIRTHNER, P.H., WUTHRICH, B. Supression of black root rot of tobacco by a *Pseudomonas* strain: Potential applications and mechanisms. In: HORNBY, D. (Ed.) **Biological control of soilborne plant pathogen**. Wallingford: CAB International, 1990. p.93-108.

- KLOEPPER, J.W., TUZUN, S., KUC, J.A. Proposed definitions related to induced disease resistance. **Biocontrol Science and Technology**, v.2, p.349-351. 1992.
- KLOEPPER, J.W., Host specificity in micro-microbe interactions. **Bioscience**, v.46, p.406-409. 1996.
- KLOEPPER, J.W., TUZUN, S., ZEHNDER, G.W., WEI, G. Multiple disease protection by rhizobacteria that induce systemic resistance – historical precedence. **Phytopathology**, v.87, p.136-137. 1997.
- LO, C.T. General mechanisms of action microbial biocontrol agentes. **Plant Pathology Bull.**, v.7, p.155-166. 1998
- LOPER, J.E., NOVAK-THOMPSON, B., WHISTLER, C.A., HAGEN, M.J., CORBELL, N.A., HENKELS, M.D., STOCKOWELL, V.O. Biological control mediated by antifungal metabolite production and resource competition: an overview. In: OGOSHI, A., KOBAYASHI, K., HOMMA, Y., KODAMA, F., KONDO, N., AKINO, S. (Eds) **Plant growth promoting rhizobacteria: present status and future prospects**. Sapporo, Japan: OECD, 1997. p.73-79.
- LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p.1-50. 1996.
- MAHAFEE, W.F., KLOEPPER, J.W. Applications of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. In: PANKHURST, C.E., DOUBE, B.M., GUPTA, V.V.S.R., GRACE, P.R. (Eds.). **Soil biota: management in sustainable farming systems**. Austrália, Victoria: CSIRO, 1994. p. 23-31.
- PAL, K.K., TILAK, K.V.B.R., SAXENA, A.K., DEY, R., SINGH, C.S. Antifungal characteristics of a fluorescent *Pseudomonas* strain involved in the biological control of *Rhizoctonia solani*. **Microbiol. Res.**, v.155, p.223-242. 2000.
- RAUPACH, G.S., KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth - promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, v.88, p.1158 -1164. 1998.
- ROMEIRO, R.S. PGPR e indução de resistência em plantas a patógenos. **Summa Phytopathologica**, v.26, p.177-183. 2000.
- ROVERATTI, D.S., TEIXEIRA, A.R.R., MORAES, W.B.C. Controle alternativo da ferrugem do cafeeiro pela utilização de produtos comerciais à base de *Bacillus thuringiensis*. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.137. 1987.
- SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., BAKKER, P.A.H.M., VAN PEER, R. Beneficial and deleterious effects of HCN producing pseudomonas on rhizosphere interactions. In: KEISTER, D.L., CREGAN, P.B. (Eds.). **The rhizosphere and plant growth**. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., pp. 211-220. 1991
- SCHROTH, M.N., HANCOCK, J. Selected topics in biological control. **Annual Review of Microbiology**, v.35, p.453-476. 1981.

- SILVA, S.R., PASCHOAL, S.F., MORAES, W.B.C. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum graminicola* agente causal da antracnose do milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.13. 1988.
- SILVA, H.S.A., ROMEIRO, R.S., MACAGNAN, D., HALFELD-VIEIRA, B.A., PEREIRA, M.C.B., MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288-295. 2003.
- STEINER, U., SCHONBECK, F. Induced disease resistance in monoct. In: HAMMERSCHMIDT, R., JOSEPH KUC (Eds.). **Induced resistance to disease in plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Pub. 1995. 182p.
- STUTZ, E. W., DÉFAGO, G., KERN, H. Naturally occurring fluorescent pseudomonas involved in suppression of black root rot of tobacco. **Phytopathology**, v.76, p.181-185. 1986.
- TEIXEIRA, D. A. **Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à ferrugem, e à mancha-de-cylindrocladium, mediadas por rizobactérias em clones de *Eucalyptus* spp.** Viçosa, MG: UFV, 2001. Dissertação (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- TURNER, J.T., BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**, v.75, p.347-353. 1991.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.26, p.379-407. 1988.
- WINGFIELD, M.J., CROUS, P.W., SWART, W.J. *Sporothrix eucalypti* (sp. Nov.), a shoot and leaf pathogens of *Eucalyptus* in South Africa. **Mycopathologia**, v.123, p.159-164. 1993.
- Van LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453-483. 1998.

1 **BIOCONTROLE DE *Quambalaria eucalypti* POR MEIO DE RIZOBACTÉRIAS<sup>1</sup>**

2 MÁRIO C. G. LADEIRA<sup>2</sup>, ACELINO C. ALFENAS, LUIZ A. MAFFIA,

3 ROBERT W. BARRETO

4 Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, CEP 36571-000,  
5 Viçosa, MG, e-mail: aalfenasl@mail.ufv.br  
6 (Aceito para publicação em xx/xx/04)  
7 Autor para correspondência: Acelino Couto Alfenas  
8

---

9 Ladeira, M. C. G.; Alfenas, A. C.; Maffia, L. A.; Barreto, R. W. Biocontrole de  
10 *Quambalaria eucalypti* por meio de rizobactérias. Fitopatologia Brasileira.  
11

12 **RESUMO**

13 Atualmente, a maior parte da produção de mudas de *Eucalyptus* spp. é  
14 realizada via propagação vegetativa, por miniestaquia. Neste sistema, o adensamento  
15 das minicepas e o regime intensivo de coleta de brotos para estaquia favorecem a  
16 incidência de doenças. Dentre estas, destaca-se o anelamento da haste e a mancha foliar,  
17 causado por *Quambalaria eucalypti*. A incidência de *Q. eucalypti* em minijardins clonais  
18 de eucalipto reduz a produção de miniestacas. Como uma alternativa de controle da  
19 doença, avaliou-se o antagonismo *in vitro* e o potencial de controle do patógeno por  
20 11 isolados de rizobactérias indutoras de enraizamento e crescimento de miniestacas de  
21 eucalipto. Todos os isolados testados inibiram, significativamente, o crescimento  
22 micelial *in vitro* do patógeno. A inibição do crescimento micelial por antibiose variou  
23 de 54,5 a 84,5 %, com máximo para o isolado FL<sub>2</sub> (*Pseudomonas aeruginosa*). A  
24 redução média do crescimento micelial por compostos antifúngicos voláteis foi de  
25 70,0 % para a maioria dos isolados testados, observando-se menor índice de inibição  
26 para os isolados S<sub>1</sub> (*Bacillus subtilis*) e R<sub>1</sub> (*Frateuria aurantia*) em ambas as repetições  
27 dos ensaios. Na avaliação da inibição da germinação de conídios, os isolados FL<sub>2</sub>, MF<sub>2</sub>  
28 (*Pseudomonas* sp.) e Ca (*Pseudomonas fulva*) não diferiram de tebuconazole. A

---

<sup>1</sup> Parte da tese de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Viçosa (2004).

<sup>2</sup> Bolsista da CAPES.

29 inibição variou de 10,0 a 93,0 %, respectivamente. Em condições de casa de vegetação,  
30 todos os isolados reduziram a severidade da doença quando aplicados 48 h antes,  
31 simultaneamente, e 48h após a inoculação do patógeno. Maiores reduções da severidade  
32 da doença ocorreram com os isolados FL<sub>2</sub> e 3918 (*Bacillus subtilis*) aplicados 48 horas  
33 antes, FL<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> (Não identificada) aplicados simultaneamente, e FL<sub>2</sub> e MF<sub>2</sub> aplicados  
34 48h após o patógeno. Minicepas clonais pulverizadas com os isolados S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, 3918 e FL<sub>2</sub>  
35 apresentaram redução significativa da área abaixo da curva de progresso de doença em  
36 até 52,3 % para folhas e 48,7 % para haste, não sendo observada diferença quanto aos  
37 intervalos de aplicação dos isolados. A aplicação das rizobactérias no substrato de  
38 enraizamento propiciou redução na severidade da doença em relação à testemunha, com  
39 destaque para o isolado FL<sub>2</sub>. Em ensaio de sensibilidade de rizobactéria a fungicidas  
40 apenas as combinações MF<sub>2</sub> x pyraclostrobin, S<sub>1</sub> e RC<sub>3</sub> x tetraconazole, e S<sub>1</sub>, CIIB  
41 (*Stenotrophomonas maltophilia*) e 3918 x tebuconazole foram incompatíveis. Diante  
42 destes resultados pode-se concluir que os isolados de rizobactérias testados apresentam  
43 potencial de uso em um sistema de manejo integrado para o controle de *Quambalaria*  
44 *eucalypti*. Todavia, deve-se buscar a melhor forma de aplicação e formulação destes  
45 isolados para seu uso em larga escala.

46 Palavras-chave: PGPR, *Sporothrix eucalypti*, controle biológico, doenças de viveiro,  
47 *Eucalyptus*, compostos voláteis, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*.

48

49

#### ABSTRACT

50 Presently, eucalyptus cutting production is made mostly by vegetative  
51 propagation of mini-cuttings. The incidence of *Quambalaria eucalypti*, causal agent of  
52 the stem girdling and leaf spot of eucalyptus in mini-clonal hedges of *Eucalyptus*,  
53 reduces the mini-cuttings production. As an alternative to control the disease, *in vitro*  
54 antagonism and potential of biocontrol of eleven isolates of plant growth promoting

55 rhizobacteria were tested against *Q. eucalypti*. All isolates significantly reduced *in vitro*  
56 mycelial growth of the pathogen through antibiosis or by producing antifungal volatile  
57 compounds. The mycelial growth reduction through antibiosis varied from 54.5 to  
58 81.8 %, which was maximum for the isolates FL<sub>2</sub> and R<sub>1</sub>. But in a repeated run growth  
59 reduction varied from 57.7 to 84.5 %, with a maximum for the isolate FL<sub>2</sub>. The average  
60 growth reduction by antifungal volatiles was 70.0 % for most of the isolates, observing  
61 the smallest inhibition index for the isolates S<sub>1</sub> and R<sub>1</sub>. The germination inhibition by  
62 FL<sub>2</sub>, MF<sub>2</sub> and Ca did not differ from tebuconazol. The inhibition varied from 10.0 to  
63 93.0% in the first and from 16.2 to 92.6 % in the second run. In greenhouse conditions  
64 all isolates reduced disease severity when applied 48 h before, simultaneously, or 48h  
65 after inoculation with the pathogen. The greatest disease reduction was observed with  
66 FL<sub>2</sub> and 3918, at 48 h, with FL<sub>2</sub> and RC<sub>3</sub> applied simultaneously, and FL<sub>2</sub> and MF<sub>2</sub>  
67 applied 48h after inoculation with the pathogen. Clonal mini-stumps sprayed with  
68 isolates S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, 3918 and FL<sub>2</sub> showed significant reduction of the area under the disease  
69 progress curve, up to 52.3 % for the leaves and 48.7 % for the stem, with no difference  
70 among time intervals of application of the isolates. Application of rhizobacteria in the  
71 rooting substrate resulted in reduction of the disease severity when compared to the  
72 control, with a good result for FL<sub>2</sub>. The isolates x fungicide compatibility tests showed  
73 that MF<sub>2</sub> x pyraclostrobin, S<sub>1</sub> and RC<sub>3</sub> x tetraconazole, and S<sub>1</sub>, CIIB and 3918 x  
74 tebuconazole were incompatible. From these results it can be concluded that the  
75 rhizobacterial isolates tested have the potential to be used in an integrated system to  
76 control eucalyptus stem girdling and leaf spot caused by *Q. eucalypti*. However, these  
77 isolates should be submitted to complementary tests and formulation to be used in a  
78 large scale.

79 Key words: PGPR's, *Sporothrix eucalypti*, biological control, nursery diseases,  
80 *Eucalyptus*, volatile compounds, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas*.

81

82

### 83 INTRODUÇÃO

84 Atualmente, a produção de mudas de eucalipto é realizada via propagação  
85 vegetativa, por miniestaquia. Neste sistema, um maior controle do ambiente e de  
86 nutrição das minicepas propicia maiores índices de produtividade (Assis, 1997; Alfenas  
87 *et al.*, 2004). Contudo, o adensamento das minicepas e o regime intensivo de coleta de  
88 brotos para estaquia podem favorecer a ocorrência de algumas doenças. Dentre estas,  
89 destaca-se o anelamento da haste e a mancha foliar causadas pelo fungo *Quambalaria*  
90 *eucalypti* (Wingfield, Crous & Swart) Simpson.

91 A primeira descrição do patógeno ocorreu no início dos anos 90, na África do  
92 Sul (Wingfield *et al.*, 1993). No final de 2000, constatou-se o fungo no Sul do Brasil em  
93 minicepas e em mudas seminais de *Eucalyptus globulus* Labill, *E. maidenii* F. Muell e  
94 seus híbridos, sendo hoje encontrado em praticamente todo o território nacional. O  
95 patógeno provoca o anelamento de haste de mudas e minicepas e, menos  
96 freqüentemente, pode incidir em miniestacas na fase de enraizamento. Nas folhas, as  
97 lesões adquirem coloração marrom, às vezes de contorno arroxeadado e de formato  
98 variável. Na face inferior do limbo foliar e sobre os demais órgãos afetados, forma-se  
99 uma massa pulverulenta de esporulação branca e seca do patógeno (Alfenas *et al.*, 2001;  
100 Alfenas *et al.*, 2004).

101 Os prejuízos ocasionados pelo patógeno, como redução do número de miniestacas  
102 por cepa, faz com que medidas alternativas para minimizar perdas sejam estudadas,  
103 destacando-se técnicas de controle biológico. Há poucos relatos sobre o emprego de

104 agentes de controle biológico contra patógenos na área florestal (Bettiol *et al.*, 1998).  
105 Contudo, as condições uniformes de ambiente e substrato em viveiros de eucalipto,  
106 principalmente em minijardins clonais, aumentam as chances de sucesso de métodos  
107 biológicos no controle de doenças.

108 O controle biológico de doenças de plantas, incluindo o uso de rizobactérias  
109 promotoras de crescimento de plantas (PGPR), é uma alternativa promissora para o controle  
110 de doenças em várias culturas (Weller, 1988; Kloepper *et al.*, 1992; Kloepper, 1996),  
111 incluindo doenças em viveiros clonais de eucalipto (Alfenas *et al.*, 2004). As PGPR  
112 (“plant growth promoting rhizobacteria”) são rizobactérias benéficas, que estimulam o  
113 crescimento de plantas e podem também induzir resistência em plantas a patógenos  
114 (Schroth & Hancock, 1981). Como agentes de biocontrole, atuam principalmente por  
115 antibiose, competição, produção de compostos voláteis tóxicos e, ou, indução de  
116 resistência sistêmica a doenças em plantas (Lo, 1998), destacando-se espécies do gênero  
117 *Pseudomonas*, *Bacillus* e actinomicetos do gênero *Streptomyces* (Mahafee & Kloepper,  
118 1994; Luz, 1996).

119 O sucesso do uso de bactérias no controle de doenças, já se reflete na  
120 disponibilidade no mercado, principalmente norte-americano, de formulações de PGPR.  
121 Como exemplo, tem-se o produto Kodiak, à base de *Bacillus subtilis*, usado no controle  
122 de tombamento de mudas em diversas culturas. Kodiak é compatível com vários  
123 fungicidas como metalaxyl, thiram, carboxin, captan e PCNB (Turner & Backman,  
124 1991; Luz, 1996). Esta compatibilidade possibilita o uso integrado de produtos  
125 químicos e biológicos em um programa de manejo, permitindo reduzir as aplicações de  
126 fungicidas. Em eucalipto observou-se redução da severidade de ferrugem (*Puccinia*  
127 *psidii* Winter) quando miniestacas foram enraizadas em substrato tratado com  
128 rizobactérias (Teixeira, 2001).



154 **Inibição do crescimento micelial de *Quambalaria eucalypti* por rizobactérias**

155 Testou-se a eficiência *in vitro* dos isolados de rizobactérias (Tabela 1) quanto à  
156 capacidade em reduzirem o crescimento micelial de *Q. eucalypti*. Para tal, fez-se uma  
157 estria de suspensão de rizobactéria no centro de cada placa de Petri contendo meio V8.  
158 Em duas extremidades opostas de cada placa depositou-se um disco de micélio de 5 mm  
159 de diâmetro, removido de colônias de *Q. eucalypti* em franco crescimento, com 4 dias  
160 de incubação. A testemunha consistiu de uma estria de água destilada esterilizada no  
161 centro da placa. Após 12 dias, avaliou-se a inibição do crescimento micelial por meio de  
162 medições do raio das colônias a partir do centro do disco de micélio, em direção à estria  
163 central. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos  
164 e quatro repetições, sendo cada tratamento constituído por um isolado de rizobactéria,  
165 ou água, confrontado ao isolado de *Q. eucalypti*.

166

167 **Inibição do crescimento micelial de *Quambalaria eucalypti* por compostos**  
168 **antifúngicos voláteis**

169 Avaliou-se, segundo metodologia proposta por Mariano (1993), a produção *in*  
170 *vitro* de compostos voláteis sobre o crescimento micelial de *Q. eucalypti*. Para isso, os  
171 isolados de rizobactérias foram semeados individualmente em placas de Petri contendo  
172 meio 523 (Kado & Heskett, 1970). Em outra placa, contendo meio V8, foi depositado  
173 um disco de cultura de *Q. eucalypti*. As tampas das placas foram removidas e  
174 substituídas por um círculo de papel celofane esterilizado. A seguir, os lados abertos de  
175 cada placa foram justapostos, e o conjunto mantido unido por um filme de PVC. Como  
176 testemunha, utilizou-se o mesmo conjunto, mantendo-se o meio destinado ao cultivo das  
177 rizobactérias estéril e o meio V8 repicado com o patógeno. Após 12 dias, aferiu-se o  
178 diâmetro da colônia do fungo com auxílio de uma régua. O delineamento experimental

179 foi inteiramente casualizado, com 12 tratamentos e quatro repetições. Cada placa  
180 representou uma repetição, sendo cada tratamento constituído por um isolado de  
181 rizobactéria confrontado ao isolado de *Q. eucalypti*.

182

### 183 **Germinação de conídios de *Quambalaria eucalypti* em suspensão de inóculo de** 184 **isolados de rizobactérias**

185 Os isolados de rizobactérias foram testados *in vitro* quanto à capacidade de  
186 inibir a germinação de conídios de *Q. eucalypti*. Tebuconazole a 0,4 g do i.a./L e água  
187 destilada e esterilizada foram utilizados como comparadores. A suspensão de conídios  
188 do patógeno foi ajustada para  $2 \times 10^4$  conídios/mL, e os isolados de rizobactérias, para  
189  $10^8$  ufc/mL. Adicionou-se uma alíquota de 1 mL de cada suspensão, incluindo as  
190 testemunhas, a 1 mL da suspensão de conídios. Após homogeneização da amostra,  
191 50 µL da suspensão foi depositada em cada uma das três cavidades de lâminas  
192 escavadas de vidro. A 24 h de incubação, avaliou-se o número de conídios germinados e  
193 não-germinados. Para tanto, realizaram-se três leituras em cada cavidade da lâmina.  
194 Foram considerados como germinados os conídios que apresentaram tubo germinativo  
195 de comprimento maior ou igual à maior dimensão do esporo. Utilizou-se delineamento  
196 inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento, sendo cada repetição  
197 constituída por três cavidades na lâmina de vidro.

198

### 199 **Eficiência da pulverização de rizobactérias no controle de *Quambalaria eucalypti*** 200 **em mudas e em minicepas de eucalipto**

201 Instalaram-se dois ensaios, um em mudas mantidas em casa de vegetação e  
202 inoculadas artificialmente com o patógeno, em Viçosa-MG, e outro em minicepas  
203 clonais com infecção natural de *Q. eucalypti*, em Curvelo-MG. Para o primeiro ensaio,

204 mudas do clone 6872 de *E. urophylla* S.T. Blake x *E. maideni* F. Muell, cultivadas em  
205 casa de vegetação, foram inoculadas com *Q. eucalypti*, a  $2,0 \times 10^5$  conídios/mL, e  
206 atomizadas com suspensão dos onze isolados de rizobactérias a  $10^8$  ufc/mL, ou com  
207 tebuconazole a 0,4 g do i.a./L como comparador. Plantas pulverizadas com água  
208 destilada estéril serviram como testemunha. As aplicações de rizobactérias foram  
209 realizadas 48 h antes, simultaneamente, e 48 h após a inoculação do patógeno. O  
210 experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema  
211 fatorial, utilizando-se seis repetições, uma planta por repetição. As mudas inoculadas  
212 com o patógeno foram mantidas sob condições de câmara úmida por 24h, constituída  
213 por uma armação de arame envolvida por plástico transparente, borrifada internamente  
214 com água, e mantidas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h. Após a remoção da câmara  
215 úmida, as mudas foram mantidas nas mesmas condições de ambiente por 14 dias,  
216 quando se avaliou a severidade da doença, segundo a escala diagramática descrita em  
217 Alfenas *et al.* (2004).

218 No segundo ensaio, minicepas do clone 3334 de *E. grandis* W. Hill ex  
219 Maidem x *E. urophylla* foram pulverizadas com suspensão de inóculo dos isolados S<sub>1</sub>,  
220 S<sub>2</sub>, 3918 e FL<sub>2</sub>, a  $10^8$  ufc/mL, para comprovação da eficiência do controle em período  
221 favorável à doença, sob condições de infecção natural em viveiro. Pulverizações do  
222 fungicida tebuconazole a 0,4 g do i.a./L serviram como comparação. As aplicações de  
223 rizobactérias e do fungicida foram realizadas a intervalos de 4 e 8 dias, durante 48 dias.  
224 Utilizaram-se quatro repetições por tratamento, com 120 plantas cada, em esquema  
225 fatorial. Dez plantas de cada repetição foram sorteadas e identificadas para avaliação da  
226 doença a cada 15 dias, contando-se o número de hastes e o número de folhas doentes  
227 por minicepa.

228

229 **Efeito da rizobacterização do substrato sobre a severidade da mancha foliar de**  
230 ***Quambalaria eucalypti* em mudas de eucalipto**

231 Miniestacas do clone 3334 de *E. grandis* x *E. urophylla* foram estaqueadas em  
232 tubetes plásticos cônicos de 50 mL de capacidade, contendo substrato à base de  
233 composto de casca de arroz carbonizada: vermiculita (1:1), previamente tratado com  
234 5 mL de suspensão a  $10^8$  ufc/mL dos respectivos isolados bacterianos (Tabela 1)”, em  
235 um viveiro comercial na cidade de Curvelo-MG. A testemunha consistiu da aplicação  
236 de água destilada no substrato. Decorridos 45 dias, as estacas enraizadas foram  
237 transportadas para o Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa,  
238 e transplantadas para vasos plásticos de 2 L de capacidade. Aos 80 dias de idade, com o  
239 auxílio de um atomizador De Vilbiss nº 15, pulverizou-se, nas mudas, suspensão de  
240 inóculo de *Q. eucalypti*, a  $2,0 \times 10^5$  conídios/mL, contendo 0,1 % de Tween 80. As  
241 mudas inoculadas com o patógeno foram mantidas sob condições de câmara úmida por  
242 24h, constituída por uma armação de arame envolvida por plástico transparente,  
243 borrifada internamente com água, e mantidas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12h. Após  
244 14 dias, avaliou-se a severidade da doença, utilizando-se o programa Quant (Filho *et al.*,  
245 2002). Foram utilizadas cinco repetições, em delineamento inteiramente casualizado,  
246 sendo o par de folhas mais jovem e completamente expandidos de cada planta  
247 considerada como uma repetição.

248

249 **Sensibilidade de rizobactérias a fungicidas**

250 Visando avaliar a possibilidade do uso de rizobactérias como parte do manejo  
251 integrado de doenças em viveiros, confrontou-se os isolados aos seguintes fungicidas,  
252 nas respectivas concentrações de i.a./L: azoxystrobin (0,1 g), pyraclostrobin (0,25 g),  
253 tetraconazole (0,2 g), tebuconazole (0,4 g), triadimenol (0,5 g), epoxiconazole +

254 pyraclostrobin (0,1 g + 0,266 g), epoxiconazole (0,19 g), trifloxystrobin (0,1 g),  
255 propiconazole + trifloxystrobin (0,175 g + 0,175 g) e propineb (1,4 g). Os fungicidas  
256 foram selecionados pela comprovada eficiência em reduzir o crescimento micelial de  
257 *Q. eucalypti in vitro* e por controlar outros patógenos de viveiros florestais (*Rhizoctonia*  
258 *solani* Kuhn, *Cylindrocladium* spp. e *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr) (Alfenas *et al.*, 2004).  
259 Para tal, discos de papel filtro (nº 2) foram embebidos nos respectivos fungicidas, e  
260 posteriormente transferidos para placas de Petri contendo meio 523, previamente  
261 semeadas com 0,1 mL de suspensão de rizobactérias a  $10^8$  ufc/mL. Incubaram-se as  
262 placas a  $27 \pm 2$  °C, e 48 h após avaliou-se a presença ou ausência de halos de inibição.  
263 O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, no esquema  
264 fatorial com quatro repetições. Cada placa representou uma repetição.

265

#### 266 **Análises estatísticas**

267 Calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para o  
268 ensaio de pulverização de rizobactérias em minicepas clonais. Os dados originais de  
269 severidade de doença nos ensaios de pulverização de rizobactérias em mudas e de  
270 tratamento de substrato com rizobactérias foram transformados para arco seno ( $\sqrt{x}/100$ )  
271 e  $\sqrt{x}$ , respectivamente. Para a avaliação da eficiência da pulverização de rizobactérias  
272 no controle de *Q. eucalypti* em mudas e em minicepas clonais de eucalipto, realizou-se  
273 análise de variância em esquema fatorial. Os dados de cada ensaio foram submetidos à  
274 análise de variância e as médias comparadas conforme o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As  
275 análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SAS V.8  
276 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

277

## RESULTADOS

278

### 279 **Inibição do crescimento micelial de *Quambalaria eucalypti* por rizobactérias**

280 Todos os isolados bacterianos testados inibiram o crescimento micelial do  
281 patógeno em relação à testemunha ( $F > 0,0001$ ). O crescimento micelial variou de 3,0 a  
282 7,5 cm no primeiro ensaio e de 2,6 a 7,1 cm no segundo, com grau de inibição variando  
283 de 54,5 a 81,8% e 84,5 a 57,7%, respectivamente. Os isolados FL<sub>2</sub>, R<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> foram os  
284 mais eficazes, enquanto MF<sub>2</sub>, CIIB e Ca apresentaram a menor capacidade inibitória  
285 (Tabela 2).

286

### 287 **Inibição do crescimento micelial de *Quambalaria eucalypti* por compostos** 288 **antifúngicos voláteis**

289 De acordo com os resultados, todos os isolados testados produziram  
290 compostos voláteis que reduziram o crescimento micelial do patógeno ( $F > 0,0001$ ). O  
291 crescimento micelial variou de 5,0 a 10,0 cm no primeiro ensaio e de 5,2 a 7,5 cm no  
292 segundo, com grau de inibição variando 71,4 a 42,9% e de 71,1 a 58,3%  
293 respectivamente (Tabela 2).

294

### 295 **Germinação de conídios de *Quambalaria eucalypti* em suspensão de inóculo de** 296 **isolados de rizobactérias**

297 Analogamente ao observado para crescimento micelial, todos os isolados de  
298 rizobactérias testados reduziram a germinação do fungo ( $F > 0,0001$ ), destacando-se os  
299 isolados FL<sub>2</sub>, MF<sub>2</sub> e Ca. No primeiro ensaio a germinação de conídios variou de 6,0 a  
300 78,1, enquanto no segundo variou de 6,5 a 74,2. O grau de inibição variou de 93,0 a  
301 10,0%, e 92,6 a 16,2%, não diferindo de tebuconazole (Tabela 2).

302

303 **Eficiência da pulverização de rizobactérias no controle de *Quambalaria eucalypti*,**  
304 **em mudas e em minicepas de eucalipto**

305 O controle de *Q. eucalypti* em mudas de eucalipto variou com o isolado e os  
306 intervalos de aplicação testados ( $F > 0,0001$ ). Observou-se tendência de maior eficácia  
307 quando os isolados de rizobactérias foram aplicados 48 h antes ou simultaneamente ao  
308 patógeno (Tabela 3). Menor severidade de doença foi obtida com a pulverização dos  
309 isolados FL<sub>2</sub> e 3918, 48h antes, FL<sub>2</sub> e RC<sub>3</sub> simultaneamente, e FL<sub>2</sub> e MF<sub>2</sub> pulverizados  
310 48 h depois da inoculação do patógeno, embora não tenham diferido significativamente  
311 dos demais isolados e de tebuconazole.

312 Minicepas clonais pulverizadas com os isolados FL<sub>2</sub>, 3918, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub>  
313 apresentaram redução significativa da AACPD ( $F > 0,0008$ ) de até 52,3% para folhas e  
314 48,7% para haste, não se observando diferença entre os intervalos de aplicação  
315 (Tabela 4).

316

317 **Efeito da rizobacterização do substrato sobre a severidade da mancha foliar de**  
318 ***Quambalaria eucalypti* em mudas de eucalipto**

319 Em mudas clonais produzidas em substrato rizobacterizado, ocorreram menor  
320 severidade da doença que em substrato não-rizobacterizado ( $F > 0,0001$ ). No primeiro  
321 ensaio, as mudas produzidas em substrato rizobacterizado apresentaram redução da  
322 severidade da doença, que não diferiram da testemunha, exceto com o isolado FL<sub>2</sub>, que  
323 promoveu redução de 74,5% (Tabela 5). No segundo ensaio, os tratamentos com todos  
324 os isolados bacterianos reduziram a severidade da doença. Neste ensaio, como no  
325 anterior, confirmou-se maior eficiência de controle com aplicação do isolado FL<sub>2</sub>,  
326 proporcionando redução da severidade da doença de 73,4 % (Tabela 5).

327

328 **Sensibilidade de rizobactérias a fungicidas**

329           Apenas as combinações MF2 x pyraclostrobin, S1 e RC3 x tetraconazole, e  
330 S1, CIIb e 3918 x tebuconazole foram incompatíveis.

331

332

333

**DISCUSSÃO**

334           Com a inibição do crescimento micelial de *Q. eucalypti*, pelos métodos de  
335 culturas pareadas e pela técnica de placa invertida, sugere-se a produção, pelos isolados  
336 de rizobactérias, de metabolitos não-voláteis e voláteis, respectivamente. Diante destes  
337 resultados, conclui-se que os isolados testados produziram substâncias antifúngicas *in*  
338 *vitro*, que se difundiram através do meio, e, ou, compostos voláteis, tóxicos ao  
339 patógeno, resultando na inibição de seu crescimento micelial.

340           Alguns isolados tiveram comportamento diferenciado quanto à inibição do  
341 patógeno, em função do teste aplicado. O isolado FL<sub>2</sub> (*Pseudomonas aeruginosa*)  
342 destacou-se quanto à capacidade de inibição do crescimento micelial por antibiose  
343 direta, porém não diferiu dos outros isolados pela produção de compostos antifúngicos  
344 voláteis. Analogamente, os isolados de *Bacillus subtilis* (S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e 3918), que se  
345 destacaram na inibição do crescimento micelial por antibiose direta, foram menos  
346 efetivos em reduzir a germinação do patógeno *in vitro*.

347           Todos os isolados testados neste trabalho produziram compostos voláteis. Tais  
348 compostos, como amônia e ácido cianídrico (HCN), produzidos por linhagens de  
349 rizobactérias, são considerados metabólitos importantes no biocontrole de  
350 microrganismos (Luz, 1996). A produção de HCN parece ser um fenômeno comum  
351 entre as rizobactérias, podendo também atuar como promotor do crescimento das  
352 plantas diretamente, por meio do aumento do desenvolvimento de pêlos radiculares.

353 Algumas espécies de *Pseudomonas* podem produzir níveis de HCN *in vitro* tóxicos a  
354 certos patógenos fúngicos, como *Thielabiosis basicola* em tabaco por *P. fluorescens*  
355 (Dowling & O’Gara, 1994). Wei *et al.* (1991) verificaram que isolados de *P.*  
356 *fluorescens*, *P. putida* e *P. aureofaciens* produziram HCN *in vitro* capazes de inibir o  
357 crescimento micelial de *Pythium ultimum* Trow, *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum*  
358 *orbiculare* (Berk. And Mont.).

359 A inibição da germinação de esporos constatada neste trabalho pode ser  
360 explicada pela produção de antibióticos pelos isolados, em particular o FL<sub>2</sub>, com 93,0 %  
361 inibição. Bettiol & Várzea (1992), verificaram inibição *in vitro* da germinação de  
362 urediniósporos de *Hemileia vastatrix* Berk and Br. por *B. subtilis*. Para *Q. eucalypti*, os  
363 melhores isolados (S<sub>1</sub> e 3918) de *B. subtilis* inibiram cerca de 70,0 % da germinação.  
364 Resultado semelhante foi observado em ensaio de inibição de germinação *in vitro* de  
365 conídios de *Fusarium graminearum* Schwabe, realizado por Perondi *et al.* (1996),  
366 mostrando que isolados de *P. fluorescens* (63/88.4b) foram mais efetivos que *B. subtilis*.

367 A aplicação de antagonistas, com reconhecida capacidade antagônica e não-  
368 residentes de filoplano, comum em ensaios de controle biológico de doenças de parte  
369 aérea de plantas, tem como vantagem redução no tempo de seleção dos antagonistas nas  
370 fases iniciais do trabalho. No presente estudo, bactérias originadas da rizosfera foram  
371 testadas como agentes de biocontrole por meio da aplicação na parte aérea de plantas de  
372 eucalipto. Analogamente aos resultados deste trabalho, isolados de *B. subtilis*,  
373 originários do solo, reduziram em 95,0% o número de pústulas de ferrugem do feijoeiro  
374 em condições de casa de vegetação quando aplicados de 2 a 120 horas antes da  
375 inoculação de *Uromyces phaseoli* (Rebent) Wint. (Baker *et al.*, 1983). A adaptação no  
376 filoplano é um dos problemas levantados quando se procura utilizar microrganismos de  
377 outras partes da planta ou do solo. Entretanto, *Trichoderma*, isolado de solo, sobrevive

378 por longo período em folhas de morangueiro (Vitti & Ghini, 1990). No presente  
379 trabalho observou-se maior eficiência dos isolados de rizobactérias no controle de *Q.*  
380 *eucalypti* em mudas quando aplicados antes ou simultaneamente à inoculação do  
381 patógeno, analogamente ao obtido por Michereff *et al.* (1994), ao utilizar *P. fluorescens*,  
382 *P. marginalis* e *B. subtilis* no controle de *C. graminicola* em sorgo. Segundo esses  
383 autores, o efeito protetor dos isolados de *P. fluorescens* pode estar associado à liberação  
384 de substâncias inibitórias no filoplano. Baker *et al.* (1983) e Bettiol *et al.* (1998)  
385 encontraram maior efetividade de *B. subtilis* quando aplicado 24 h antes da inoculação  
386 de *Uromyces phaseoli* e *Cylindrocladium scoparium* Morgan, fato também observado  
387 para o isolado 3918 deste trabalho. Acredita-se que metabólitos produzidos pelo agente  
388 de biocontrole atuem reduzindo a germinação de esporos e, ou, desenvolvimento do  
389 tubo germinativo. Outra explicação seria a indução de resistência localizada no  
390 hospedeiro pelos antagonistas (Martins *et al.*, 1985). A menor efetividade dos isolados,  
391 quando aplicados 48 h após a inoculação do fungo, pode estar associada à baixa  
392 capacidade de colonização e competitividade destes antagonistas, após o  
393 estabelecimento do patógeno, e, ou, baixa vulnerabilidade do patógeno após o  
394 estabelecimento. Com a pulverização dos isolados S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, 3918 e Fl<sub>2</sub> em minicepas  
395 clonais, ocorreram redução da AACPD de até 52,3% em folhas e 48,7% em hastes,  
396 independentemente do intervalo de aplicação. Provavelmente, condições de ambiente e  
397 de manejo do minijardim influenciaram tal resposta, uma vez que em condições de casa  
398 de vegetação observou-se diferença significativa entre os intervalos, mesmo sendo estes  
399 de apenas 48 h. Pelos resultados obtidos *in vitro*, confrontados aos de pulverização em  
400 plantas em casa de vegetação e viveiro, sugere-se que nem todos os isolados que  
401 exerceram antibiose *in vitro* são eficazes no biocontrole *in vivo*.

402 A resistência sistêmica induzida no hospedeiro pode constituir um importante  
403 mecanismo de ação no sistema estudado, uma vez que a veiculação destas rizobactérias  
404 em escala comercial seria realizada via substrato de enraizamento ou por imersão das  
405 miniestacas em suspensão dos antagonistas. Apesar da variabilidade nos dois ensaios,  
406 observaram-se indícios de indução de resistência sistêmica com os isolados testados,  
407 pois a severidade da doença nas plantas estaqueadas em substrato rizobacterizado foi  
408 menor que na testemunha. Há vários relatos do potencial de rizobactérias,  
409 principalmente do gênero *Pseudomonas*, em induzir resistência em plantas a patógenos  
410 (Romeiro, 2000; Silva *et al.*, 2003; Zhang, 2002; Enebak, 2000; Kloeper, 1996; van  
411 Loon, 1998). Teixeira (2001) verificou que o isolado FL<sub>2</sub> reduziu significativamente o  
412 número de pústulas e o número de esporos/soro de *Puccinia psidii* Winter em folhas de  
413 eucalipto quando as estacas foram tratadas com o isolado, 80 dias antes da inoculação  
414 do patógeno. A ISR pode ser observada em diferentes graus, de acordo com o genótipo  
415 e a espécie hospedeira, ambiente e o patógeno (Meyer & Hofte, 1997; van Loon *et al.*,  
416 1998). Enebak (2000) observou que sementes de *Pinus taeda* L., tratadas com  
417 rizobactérias, tiveram redução de ferrugem, causada por *Cronartium quercuum* (Berk)  
418 Miyabe ex Shirai f. sp. *fusiforme*, quando comparadas às sementes não-tratadas.

419 Para comprovação de ISR, é fundamental a realização de estudos mais  
420 detalhados. A separação espacial dos componentes microbianos de interação  
421 (rizobactérias e *Q. eucalypti*) não explica o mecanismo, pois o agente pode estar tanto  
422 induzindo resistência quanto atuando diretamente sobre o patógeno, por meio da  
423 translocação de substâncias anti-fúngicas produzidas pelo agente indutor, ou, ainda,  
424 atuando pelos dois mecanismos (van Loon *et al.*, 1998; Romeiro, 2000).

425 A compatibilidade entre agentes de controle biológico e produtos químicos é  
426 de grande importância em um programa de manejo integrado de doenças, pois permite

427 reduzir a quantidade de fungicidas utilizada, a poluição do meio ambiente e os  
428 problemas com o surgimento de isolados do patógeno resistentes a fungicidas. Assim,  
429 os resultados obtidos evidenciam a possibilidade de integrar o controle químico ao  
430 biológico, uma vez que os isolados de rizobactérias apresentaram baixa sensibilidade à  
431 maioria dos princípios ativos testados.

432 Diante destes resultados, conclui-se que os isolados de rizobactérias testados  
433 possuem potencial de uso em um sistema de manejo integrado para o controle do  
434 anelamento da haste e mancha foliar em eucalipto. É necessário que estes isolados  
435 sejam submetidos à testes complementares, como misturas de bactérias com diferentes  
436 mecanismos de supressão de doença, para uso posterior em grande escala, o que levaria  
437 à redução do uso de fungicidas e aumento do número de brotos aptos a enraizar por  
438 cepa.

439

440

441

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

442

443 ALFENAS, A. C., ZAUZA, E.A .V., ROSA, O. P. P., ASSIS, T. F. *Sporothrix*  
444 *eucalypti*, um novo patógeno do eucalipto no Brasil. Fitopatologia Brasileira, 26 (2):  
445 221, 2001.

446

447 ALFENAS, A. C., ZAUZA, E. A. V., MAFIA, R. G., ASSIS, T. F. Clonagem e  
448 Doenças do Eucalipto. Ed. UFV, 2004. 442p.

449

450 ASSIS, T.F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. Conferência  
451 IUFRO sobre Silvicultura e Melhoramento de eucaliptos. Salvador, 1: 300-304.  
452 1997.

453

454 BAKER, C. J.; STAVEL, J. R.; THOMAS, C. A.; SASSER, M.; MACFALL, J. S.  
455 Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and as development of  
456 rust pustules on bean leaves. Phytopathology, 73 (8): 1148-1152.1983.

457

458 BETTIOL, W., AUER, C. G., CAMARGO, L.E. A. & KIMATI,H. Controle da mancha  
459 foliar de *Eucalyptus grandis* e *E. urophylla* induzida por *Cylindrocladium*  
460 *scoparium* com *Bacillus* sp. Summa Phytopathologica, 14: 210-218.1998.

- 461 BETTIOL, W.; VÁRZEA, V. M. P.. Controle biológico da ferrugem (*Hemileia*  
462 *vastatrix*) do cafeeiro com *Bacillus subtilis* em condições controladas.  
463 Fitopatologia brasileira, 17: 91- 95. 1992.  
464
- 465 DOWLING, D.N., O' GARA, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the  
466 biocontrol of plant disease. Trends Biotechnol., 12: 133-141. 1994.  
467
- 468 ENEBAK, S.A., CAREY, W. A. Evidence for induced systemic protection to fusiform  
469 rust in loblolly pine by plant growth-promoting rhizobactéria. Plant Disease, 84:  
470 306-308. 2000.  
471
- 472 FILHO, E. I. F.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L.; LIBERATO, J. R. Quantificação de  
473 Doenças de Plantas. Quant v.1.0.0.22. Universidade Federal de Viçosa, M.G. 2002.  
474
- 475 KADO, C.I., HESKETT, M.S. Selective media for isolation of *Agrobacterium*,  
476 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology, 60:  
477 969-976. 1970.  
478
- 479 KLOEPPER, J.W., TUZUN, S., KUC, J.A. Proposed definitions related to induced  
480 disease resistance. Biocontrol Science Technology, 2: 349-351. 1992.  
481
- 482 KLOEPPER, J.W., Host specificity in micro-microbe interactions. Bioscience, 46: 406-  
483 409. 1996.  
484
- 485 LO, C. T. General mechanisms of action microbial biocontrol agentes. Plant Pathology  
486 Bull. 7: 155-166. 1998  
487
- 488 LUZ, W.C. da. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção.  
489 Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4: 1-50. 1996.  
490
- 491 MAHAFFE, W.F., KLOEPPER, J.W. Applications of plant growth promoting  
492 rhizobacteria in sustainable agriculture. In PANKHURST, C.E., DOUBE, B.M.,  
493 GUPTA, V.V.S.R., GRACE, P.R. (eds.). Soil biota: management in sustainable  
494 farming systems. Austrália, Victoria: CSIRO, p. 23-31, 1994.  
495
- 496 MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para controle microbiológico de  
497 patógenos de plantas. RAPP, 1: 369-409. 1993.  
498
- 499 MARTINS, E. M. F., BERETTA, M. J. G., ROVERATTI, D. S. & MORAES, W. B. C.  
500 Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-  
501 specific inducer from different fungal and bacterial origins. Fitopatologia brasileira,  
502 10: 521-529. 1985.  
503
- 504 MEYER, G. De, HOFTE, M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium  
505 *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis*  
506 *cinerea* on bean. Phytopathology, 87: 588-593. 1997.  
507
- 508 MICHEREFF, S. H.; SILVEIRA, N. S. S.; MARIANO, R. L. R.; Antagonismo de  
509 bactérias sobre *Colletotrichum graminicola* e potencial de biocontrole da  
510 antracnose do sorgo. Fitopatologia brasileira, 19(4): 541-545. 1994.

- 511 MILLER, P. M. V8 juice as general purpose medium for fungi and bacteria.  
512 Phytopathology, 45: 461. 1995.  
513
- 514 PERONDI, N. L.; LUZ, W. C.; THOMAS, R.. Controle microbiológico da giberela do  
515 trigo. Fitopatologia brasileira, 21: 243-249. 1996.  
516
- 517 ROMEIRO, R. S. PGPR e indução de resistência em plantas a patógenos. Summa  
518 phytopathologica, 26: 177- 183. 2000.  
519
- 520 SCHROTH, M.N., HANCOCK, J. Selected topics in biological control. Annual Review  
521 of Microbiology, 35: 453-476. 1981.  
522
- 523 SILVA, H. S. A., ROMEIRO, R. S., MACAGNAN, D., HALFELD-VIEIRA, B. A.,  
524 PEREIRA, M. C. B., MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic  
525 resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme  
526 activities. Biological Control, 29: 288-295. 2003.  
527
- 528 TEIXEIRA, D. A. Promoção de enraizamento e indução de resistência sistêmica à  
529 ferrugem, e à mancha-de-*cylindrocladium*, mediadas por rizobactérias em clones de  
530 *Eucalyptus* spp. Universidade Federal de Viçosa, DS, Dezembro de 2001.  
531
- 532 TURNER, J.T., BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases following  
533 *Bacillus subtilis* seed treatment. Plant Disease, 75: 347-353. 1991.  
534
- 535 WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUM, S. Induction of systemic resistance of cucumber  
536 to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting  
537 rhizobacteria. Phytopathology, 81: 1508-1512. 1991.  
538
- 539 WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with  
540 bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407. 1988.  
541
- 542 WINGFIELD, M. J., CROUS, P. W., SWART, W. J. *Sporothrix eucalypti* (sp. Nov.), a  
543 shoot and leaf pathogens of *Eucalytus* in South Africa. Kluwer academic  
544 Publishers. Mycopathologia. 123: 159-164. 1993.  
545
- 546 VAN LOON, L.C., BAKKER, P.A.H. M., PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance  
547 induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36: 453-483.  
548 1998.  
549
- 550 VITTI, A. J.; GHINI, R. Sobrevivência de linhagens de *Trichoderma* resistentes a  
551 iprodione em morangueiro. Summa Phytopathologica, Jaguariúna, 16: 36. 1990.  
552
- 553 ZHANG, S., MOYNE, ANNE-LAURE, REDDY, M. S., KLOEPPER, J.W. The role of  
554 salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting  
555 rhizobacteria against blue mold of tobacco. Biological Control, 25: 288-296. 2002.  
556
- 557
- 558

559 **Tabela 1** - Identificação dos isolados de rizobactérias de mudas de eucalipto utilizados  
 560 como agentes de biocontrole.  
 561

Isolados*	Identificação
Ca	<i>Pseudomonas fulva</i> Lizuga & Komagata, 1963
FL <sub>2</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter, 1872) Migula, 1900
MF <sub>2</sub> , MF <sub>4</sub>	<i>Pseudomonas</i> sp. Migula, 1894
S <sub>1</sub> , S <sub>2</sub> , 3918	<i>Bacillus subtilis</i> Cohn, 1872 / <i>B. vallismortis</i> Roberts <i>et al.</i> , 1996
CIIb	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (Hugh, 1872) Palleroni & Bradbury, 1993 / <i>S. nitritireducens</i> Finkmann <i>et al.</i> , 2000
R <sub>1</sub>	<i>Frauteria aurantia</i> Swings <i>et al.</i> , 1980
VC <sub>2</sub>	Não-identificadas
RC <sub>3</sub>	Não-identificadas

562  
 563 \*Obtidos por Teixeira (2001) e identificados utilizando-se a análise filogenética de  
 564 seqüências parciais de DNA ribossomal 16S (rDNA 16S), pela Fundação Tropical de  
 565 Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” (Campinas, SP).

566 **Tabela 2** - Crescimento micelial de *Quambalaria eucalypti* por isolados de rizobactéria  
 567 pelos métodos de cultura pareada e por compostos voláteis, e germinação de  
 568 conídios do patógeno em lâmina escavada.  
 569

Tratamento	Cultura pareada		Compostos voláteis		Lâmina escavada	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
Testemunha	16,5 a *	16,8 a *	17,5 a	18,0 a	86,8 a	88,6 a
Ca	7,5 b	7,1 b	5,2 d	5,4 b	8,7 g	9,5 fg
CIIb	7,3 bc	7,0 b	5,0 d	5,2 b	38,3 de	39,1 de
MF2	6,5 bc	6,8 b	5,5 d	5,7 b	8,3 g	9,1 fg
RC3	6,3 bc	6,5 b	5,0 d	5,2 b	60,4 bc	61,1 c
MF4	6,0 c	6,3 b	5,0 d	5,2 b	59,8 c	60,6 c
VC2	6,0 c	6,1 b	5,0 d	5,2 b	49,6 cd	49,2 cd
3918	4,3 d	4,3 cd	5,0 d	5,5 b	25,2 ef	28,0 ef
S1	4,0 d	4,5 c	10,0 b	7,5 b	24,4 f	24,6 ef
S2	3,9 d	4,1 cd	6,0 d	5,7 b	78,1 b	74,2 b
R1	3,0 d	3,1 de	7,2 c	7,3 b	39,0 de	39,3 de
FL2	3,0 d	2,6 e	5,0 d	5,2 b	6,0 g	6,5 g
CV (%)	7,63	6,34	3,6	8,44	8,23	10,92

570  
 571  
 572  
 573

\*Médias de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05).

574 **Tabela 3** - Redução da severidade do anelamento da haste e mancha foliar de  
 575 *Quambalaria eucalypti* (%), atomizadas com suspensão de inóculo de  
 576 rizobactéria em mudas de eucalipto do clone 6872, avaliada 14 dias após  
 577 inoculação do patógeno.

Tratamentos	Intervalo de aplicação das rizobactérias em relação à inoculação do patógeno		
	48 h antes	Simultaneamente	48 h após
S1	65,16 a (A) *	64,95 a (A) *	52,65 a (A) *
Ca	72,00 a (A)	88,79 b (BCD)	71,46 a (A)
CIIb	73,62 ab (AB)	84,37 b (BCD)	65,19 a (A)
S2	80,01 a (ABC)	81,21 a (ABCD)	68,72 a (A)
MF4	87,75 a (BCD)	91,94 a (CD)	75,00 b (A)
RC3	89,19 a (CDE)	95,10 a (DE)	70,90 b (A)
R1	90,03 a (CDE)	71,90 b (A)	75,88 b (A)
MF2	90,81 ab (CDE)	80,89 a (ABC)	96,78 b (B)
VC2	90,99 a (CDE)	86,10 a (BCD)	62,45 b (A)
3918	95,22 a (DE)	83,89 b (ABCD)	67,52 b (A)
FL2	97,38 a (E)	100,0 b (E)	97,10 a (B)
Fung	97,57 a (E)	100,0 a (E)	98,95 a (B)
CV (%) = 18,24			

578  
579

580 \*Médias de seis repetições. Médias seguidas pela mesma letra não diferiram entre si pelo  
 581 teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas na horizontal referem-se à comparação das  
 582 médias entre os intervalos de aplicação testados. Letras maiúsculas na vertical referem-se à  
 583 comparação dos tratamentos. Para efeito de análise estatística os dados foram  
 584 transformados para arco seno ( $\sqrt{x}/100$ ).

585 **Tabela 4** - AACPD de *Q. eucalypti* em folhas e hastes de minicepas do clone 3334 de  
 586 eucalipto pulverizadas com isolados de rizobactérias a cada quatro (Intervalo 1)  
 587 e oito dias (Intervalo 2).

Tratamento	AACPD - Folha		% redução da AACPD	
	Intervalo 1	Intervalo 2	Intervalo 1	Intervalo 2
Test	4,82 a *	4,95 a *	0,00	0,00
S2	3,58 ab	4,24 a	25,72	14,34
S1	3,28 ab	4,59 a	31,95	7,27
3918	2,89 ab	2,36 a	40,04	52,32
FL2	2,32 ab	3,26 a	51,86	34,14
Fung	1,76 b	2,40 a	63,48	51,51
CV (%) = 37,44				

588

Tratamento	AACPD - Haste		% redução da AACPD	
	Intervalo 1	Intervalo 2	Intervalo 1	Intervalo 2
Test	21,01 a *	22,64 a *	0,00	0,00
Fung	17,93 ab	18,09 ab	14,65	20,09
S2	15,13 ab	11,67 b	27,98	48,45
S1	14,58 ab	13,66 b	30,60	39,66
3918	14,50 ab	13,95 ab	30,98	38,38
FL2	12,36 b	11,61 b	41,17	48,71
CV (%) = 23,79				

589

590 \*Médias de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem  
 591 significativamente entre si, pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

592 **Tabela 5** - Área foliar lesionada (cm<sup>2</sup>) por *Quambalaria eucalypti* em mudas de eucalipto  
 593 do clone 3334, produzidas em substrato rizobacterizado.

Tratamento	Área foliar lesionada (cm <sup>2</sup> )		Redução (%)	
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
CIlb	3,86 a *	2,01 abc *	> 8,12	42,57
Testemunha	3,57 ab	3,50 a	0,00	0,00
R1	2,74 abc	1,28 bc	23,24	63,14
RC3	2,71 abc	2,68 ab	23,57	23,42
S2	1,98 abc	1,58 bc	44,53	54,85
VC2	1,50 abc	1,19 bc	57,98	66,00
Ca	1,49 bc	1,23 bc	58,26	64,85
MF4	1,35 bc	1,08 bc	62,18	69,14
MF2	1,28 bc	1,04 bc	64,14	70,28
S1	1,19 bc	1,10 bc	66,66	68,57
3918	1,14 bc	0,98 bc	68,06	72,00
FL2	0,91 c	0,93 c	74,50	73,42
CV (%)	28,45	24,9		

594  
 595  
 596  
 597  
 598

\*Médias de cinco repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (p<0,05). Dados originais foram transformados para  $\sqrt{x}$ .

## CONCLUSÕES GERAIS

Com relação aos ensaios realizados, conclui-se que:

- 1) Todos os isolados testados, principalmente FL<sub>2</sub> e R<sub>1</sub>, reduziram o crescimento micelial do patógeno pelo teste de antibiose;
- 2) Todos os isolados reduziram o crescimento micelial do patógeno pela produção de composto volátil;
- 3) Todos os isolados, principalmente FL<sub>2</sub>, MF<sub>2</sub> e Ca, reduziram a germinação de conídios do fungo;
- 4) Controle mais eficiente de *Q. eucalypti*, em casa de vegetação, foi obtido com aplicação dos isolados 48h antes e simultaneamente à inoculação do patógeno.
- 5) Com a aplicação dos isolados S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, 3918 e FL<sub>2</sub> em minicepas clonais, obteve-se redução significativa da AACPD de até 52,3% para folhas e 48,7% para haste;
- 6) A aplicação dos isolados de rizobactérias, especialmente FL<sub>2</sub>, no substrato de enraizamento, proporcionou redução da severidade da doença;
- 7) A maioria das combinações de isolados de rizobactéria e fungicida foi compatível, o que demonstra o potencial de uso destes microrganismos em associação com controle químico no manejo de *Q. eucalypti*.