

CLÁUDIO BELMINO MAIA

**SUPRESSÃO DA MURCHA-VASCULAR DO FEIJOEIRO POR
MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

CLÁUDIO BELMINO MAIA

**SUPRESSÃO DA MURCHA-VASCULAR DO FEIJOEIRO POR
MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de "*Doctor Scientiae*".

APROVADA: 27 de abril de 2004.

Prof. Robert Weingart Barreto
(Conselheiro)

Dr. Trazilbo José de Paula Júnior

Prof. Laércio Zambolim

Prof^a. Rosângela D'Arc de Lima Oliveira

Prof. Onkar Dev Dhingra
(Orientador)

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e a ciência do santo, a prudência”

Pv. 9: 10.

Aos meus pais Cosme e Maria Belmino pelo amor e esforço para que eu estudasse.

À minha esposa Claudia pelo amor, confiança e dedicação.

À minha filha Laura pelos momentos que passei sem sua presença.

AGRADECIMENTOS

À Deus, “porque o Senhor dá a sabedoria e da sua boca vem o conhecimento e o entendimento” (Pv. 2:6).

À minha esposa Claudia e minha filha Laura pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

À minha família, pelo incentivo, apoio e confiança.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos e pela oportunidade para realização do Curso.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo.

Ao Professor Onkar Dev Dhingra, pela orientação e ensinamentos durante a condução do trabalho.

Aos colegas da Clínica de Doenças de Plantas da UFV, pela ajuda prestada durante a realização deste trabalho e a convivência agradável.

Aos colegas de curso e funcionários do DFP, pela convivência e amizade demonstradas.

Aos irmãos da Igreja Assembléia de Deus de Viçosa, pelo apoio e oração para a conclusão das etapas do curso, principalmente a irmã Vanja e ao Pastor Getúlio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CLÁUDIO BELMINO MAIA, filho de Cosme Ferreira Maia e Maria Belmino Chaves Maia, nasceu em 14 de maio de 1970, em Limoeiro do Norte, Ceará.

Em julho de 1997, concluiu o curso de graduação em Agronomia, pela Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

Em fevereiro de 2000, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Em março de 2000, iniciou o curso de Doutorado em Fitopatologia nesta mesma instituição.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
2.1. Procedimento geral.....	7
2.2. Microrganismos utilizados no trabalho.....	8
2.2.1. Isolados fúngicos.....	8
2.2.2. Isolados bacterianos.....	8
2.3. Produção de inóculo e infestação do solo.....	9
2.4. Competitividade “ <i>in vitro</i> ” de fungos e antibiose de bactérias contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	10
2.5. Competência rizosférica de <i>F. oxysporum</i> não-patogênicos e de bactérias.....	11
2.5.1. <i>F. oxysporum</i> não-patogênicos.....	11
2.5.2. Bactérias.....	12
2.6. Competitividade rizosférica de fungos e de bactérias	

contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	14
2.6.1. Ensaio 1 – Competitividade rizosférica de <i>F. oxysporum</i> não-patogênicos e contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	14
2.6.2. Ensaio 2 – Determinação da concentração de <i>F. oxysporum</i> não-patogênicos contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	15
2.6.3. Ensaio 3 – Competitividade rizosférica de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	15
2.6.4. Ensaio 4 – Competitividade rizosférica de bactérias..	16
2.6.5. Ensaio 5 – Competitividade rizosférica de bactérias contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	17
2.7. Ação individual e conjunta de microrganismos na supressão da murcha-vascular em casa de vegetação e campo.....	17
2.7.1. Efeito individual.....	17
2.7.2. Efeito conjunto em casa de vegetação.....	19
2.7.3. Efeito conjunto no campo.....	19
2.8. Análise estatística.....	20
2.9. Identificação dos isolados PF22 e TR11.....	21
3. RESULTADOS.....	22
3.1. Microrganismos.....	22
3.2. Competitividade “ <i>in vitro</i> ” de fungos e antibiose de bactérias contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	22
3.3. Competência rizosférica de <i>F. oxysporum</i> não-patogênicos e de bactérias.....	23
3.3.1. <i>F. oxysporum</i> não-patogênicos.....	23
3.3.2. Bactérias.....	24

3.4. Competitividade rizosférica de fungos e de bactérias contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	25
3.4.1. Ensaio 1 - Competitividade rizosférica de <i>F.</i> <i>oxysporum</i> não-patogênicos em solo natural e contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	25
3.4.2. Ensaio 2 – Determinação da concentração de <i>F.</i> <i>oxysporum</i> não-patogênicos contra <i>Fusarium</i> <i>oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	28
3.4.3. Ensaio 3 - Competitividade por sitio de colonização de <i>Trichoderma</i> spp. contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	29
3.4.4. Ensaio 4 – Competitividade rizosférica de bactérias..	30
3.4.5. Ensaio 5 - Competitividade rizosférica de bactérias contra <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	30
3.5. Efeito individual e conjunto de microrganismos na supressão da murcha-vascular em casa de vegetação e campo.....	31
3.5.1. Efeito individual.....	31
3.5.2. Efeito conjunto em casa de vegetação.....	36
3.5.3. Efeito conjunto no campo.....	40
4. DISCUSSÃO.....	44
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

RESUMO

MAIA, Cláudio Belmino, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2004.
Supressão da murcha-vascular do feijoeiro por microrganismos antagonistas. Orientador: Onkar Dev Dhingra. Conselheiros: Robert Weingart Barreto e Ulisses Gomes Batista.

O presente trabalho objetivou investigar o potencial de uso do controle biológico no patossistema *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e feijão a partir das seguintes etapas: 1-Selecionar um isolado de *F. oxysporum* não-patogênico (FO), um isolado de *Trichoderma* sp. (TR) e outro de *Pseudomonas* fluorescentes (PF) mais competentes e com alta competitividade rizosférica. 2-Estudar o efeito do tratamento de sementes de feijão com isolados selecionados de *Pseudomonas* fluorescentes, no desenvolvimento da murcha-vascular. 3-Estudar a relação entre a densidade de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e de *F. oxysporum* não-patogênicos adicionada no solo para supressão da forma patogênica. 4-Estudar, em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, o efeito combinado de sementes de feijão tratadas com a bactéria e plantadas em solo infestado com *F. oxysporum* não-patogênico em casa de vegetação, no desenvolvimento da murcha-vascular. 5-Estudar, em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, o efeito combinado de sementes de feijão tratadas ou não-tratadas com a bactéria e plantadas em solo infestado com *F. oxysporum* não-patogênico ou *Trichoderma* sp. e o efeito de cada potencial antagonista sozinho, no campo, no

desenvolvimento da murcha-vascular. Foram testados três isolados de FO, 11 de TR e 150 de PF, obtidos da rizosfera (80), rizoplano (30) e internamente as raízes (40). Nos testes de antibiose “*in vitro*” foram selecionados 22 isolados de PF e nos testes posteriores de competência e competitividade selecionou-se o isolado PF22 (*Pseudomonas putida*).

Testando-se a competência e competitividade de FO e TR foram selecionados os isolados TR11 de *Trichoderma (T harzianum)* e FO3 de *Fusarium* não patogênico. Observou-se que não teve diferença entre as concentrações de FO para um mesmo isolado, no entanto, foi observada diferença entre os isolados e destes com o controle. O isolado FO3 teve uma maior área abaixo da curva de decréscimo da clorofila (AACDCL) para as clorofilas A, B e total (5,38, 1,71 e 7,10, respectivamente), menor severidade da doença (2,37) e maior produção de grãos (6,65g) em relação ao FOPm sozinho, com AACDCL de 2,41, 0,87 e 3,25, respectivamente, severidade 4,25 e produção de grãos de 2,23g. O isolado PF22 sozinho não reduziu a severidade da doença. Quando FO3 e PF22 foram usados em conjunto obteve-se uma maior AACDCL para as clorofilas A, B e total (4,52, 1,05 e 5,57, respectivamente), maior produção de grãos (12,59g) e redução da severidade da doença (2,50) enquanto que FOPm sozinho teve AACDCL de 0,92, 0,23 e 1,16, respectivamente, severidade de 4,30 e produção de 5,71g de grãos.

No campo, os isolados TR11 e FO3 sozinhos ou em conjunto com PF22, não diferiram entre si quanto a AACDCL, mas diferiram do FOPm sozinho. Quanto à produção, observou-se que a associação dos microrganismos FO3 + PF22 e TR11 + PF22 não diferiram entre si, com uma produção de 15 e 14 vagens e 14,7 e 13,1 g de grãos, respectivamente. A produção do tratamento apenas com FOPm foi de 8,3 vagens e 4,5 g de grãos. Esses valores mostram um aumento de aproximadamente 200% na produção de grãos quando utilizados os microrganismos em conjunto no controle da doença no campo. A ação conjunta dos microrganismos usados neste trabalho mostrou-se uma estratégia de controle biológico promissora para a redução no solo da densidade de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e, com isso, propiciar uma redução da ocorrência e dos danos causados por essa doença.

ABSTRACT

MAIA, Cláudio Belmino, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2004. **Suppression of vascular wilt of bean by antagonistic microorganisms.** Adviser: Onkar Dev Dhingra. Committee members: Robert Weingart Barreto and Ulisses Gomes Batista.

This study aimed to investigate the potential of the biological control upon the pathosystem *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and bean, by the following procedure: 1) Selecting an isolate of non-pathogenic *F. oxysporum* (FO), an isolate of *Trichoderma* sp. (TR) and one of fluorescent *Pseudomonas* (FP), which should be more competent and have a higher degree of rhizosphere competitiveness; 2) Studying the effect of the seed treatment with those selected fluorescent *Pseudomonas* isolates upon the development of the vascular wilt; 3) Studying the relationship between the inoculum densities of the non-pathogenic *F. oxysporum* and pathogenic *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* added to the soil in order to suppress the pathogenic form. 4) Studying the combined effect of bean seed treatment with *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* and sowing in a non-pathogenic *F. oxysporum*-infested soil upon the development of the vascular wilt, under greenhouse conditions. 5) Comparing the combined effect of bean seed treatment with *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* or no treatment followed by sowing in soil infested by either non-pathogenic *F. oxysporum* or *Trichoderma* sp., as well as the effect of each antagonistist alone upon the development of the vascular wilt under field conditions. The following isolates were tested: three from FO, 11 from TR

and 150 from PF [which were obtained from the rhizosphere (80), rhizoplane (30) and internally from the roots (40)]. In the in vitro antibiosis test, twenty two PF isolates were selected, whereas in the following tests for competence and competitiveness the isolate PF22 (*Pseudomonas putida*) was selected. When testing FO and TR for competence and competitiveness, the isolates TR11 from *Trichoderma* (*T. harzianum*) and FO3 from the non-pathogenic *Fusarium* were selected. No differences were observed among the FO concentrations for the same isolate, but differences between the isolates as well as between these and the control were significant. The FO3 isolate occupied a higher area below the chlorophyll decreasing curve (AACDCL) for A, B and total chlorophylls (5.38, 1.71 and 7.10, respectively), as well as a lower disease severity (2.37) and higher bean yields (6.65g) in relation to FOPm alone, with the respective values of 2.41, 0.87 and 3.25 for AACDCL, 4.25 severity, and 2.23g for bean yield. The isolate PF22 did not reduce by itself the severity of the disease. When using FO3 and PF22 together, a higher AACDCL was obtained for the chlorophylls A, B and total (4.52, 1.05 and 5.57, respectively), as well as higher bean yields (12.59g) and reduced severity of the disease (2.50), whereas FOPm alone showed an AACDCL of 0.92, 0.23 and 1.16, respectively, 4.30 severity, and bean yield of 5.71g. Under field conditions, both the isolates TR11 and FO3 by themselves or combined with PF did not differ from each other for AACDCL, but from the FOPm alone. In relation to the yield, no differences were found for the combination of the microorganisms FO3 + PF22 and TR11 + PF22, since a total of 15 and 14 pods and 14.7 and 13.1 beans were yielded, respectively. In the treatment with FOPm alone, a total of 8.3 pods and 4.5 beans were yielded. These values show an increase of around 200% in bean yield, when the microorganisms were used in combination to control the disease in the field. In this study, the combined action of the microorganisms showed to be a promising biological control strategy for reducing the density of the *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* inoculum in the soil providing a reduction in both occurrence and damages caused by this disease.

1. INTRODUÇÃO

A murcha-vascular do feijoeiro, causada por *Fusarium oxysporum* (Schlecht.) f. sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder, caracteriza-se por clorose e lesões necróticas que se iniciam nas folhas mais velhas das plantas doentes, murcha, desfolhamento prematuro, descoloração vascular e nanismo (DONGO e MÜLLER, 1969). A doença foi relatada pela primeira vez em 1929, em campos de feijão localizados no Vale do Sacramento, na Califórnia, nos Estados Unidos da América, tendo reaparecido na mesma localidade em 1933 e 1940, quando a cultura foi novamente implantada nessa área (KENDRICK e SNYDER, 1942). Esta doença está presente em vários países como Panamá, Costa Rica (ECHANDI, 1967; PASTOR-CORRALES e ABAWI, 1987), Peru, Colômbia (DUQUE e MÜLLER, 1969), Brasil (CARDOSO *et al.*, 1966), Inglaterra (ARMSTRONG e ARMSTRONG, 1964), Holanda (RIBEIRO e HAGEDORN, 1979), Espanha (DIAZ-MINGUEZ, 1996), Grécia, Itália (ALÓJ *et al.*, 1983; ZOINA *et al.*, 1995), Egito (YOUSSEF, 1961) e Quênia (MUTITU *et al.*, 1988).

No Brasil, o primeiro relato da doença foi feito por CARDOSO *et al.* (1966) na região de Laranjal Paulista, São Paulo. Atualmente, a doença é encontrada na maioria dos estados brasileiros onde o feijão é cultivado (RAVA *et al.*, 1996). Considerada uma doença de menor importância na década de 1970, tornou-se uma das doenças mais prejudiciais ao feijão,

devido principalmente, à expansão da monocultura irrigada, com plantios sucessivos de feijão. As perdas ocasionadas pelo patógeno são variáveis, já que dependem da variedade utilizada, da infestação do solo e das características físico-químicas e biológicas do solo. Perdas de 80 a 100% foram relatadas na Costa Rica e no Brasil (ECHANDI, 1967; GOULART, 1988; ZAMBOLIM *et al.*, 1987; COSTA *et al.*, 1993). VIEIRA (1988) considerou essa doença a causa principal das mudanças periódicas das áreas de plantio do feijão.

No norte de Minas Gerais, a doença é considerada como um fator limitante para o cultivo de feijão. O patógeno sobrevive no solo por longos períodos e a rotação de cultura não diminui sua densidade de inóculo, pelo contrário, muitas espécies de plantas, cultivadas ou não, atuam como hospedeiros reservatórios deste patógeno permitindo assim a renovação do inóculo a cada safra (ARMSTRONG e ARMSTRONG, 1963; RIBEIRO e HAGEDORN, 1979; SALGADO *et al.*, 1994; COELHO NETTO, 1998; COELHO NETTO e DHINGRA, 1997, 1999). O emprego de cultivares resistentes é o melhor caminho para o controle e, embora disponíveis, não são populares em grande parcela da população brasileira, que prefere consumir as variedades do grupo “carioquinha”. Estes cultivares em geral são suscetíveis à doença.

Diante das incertezas dos meios convencionais de controle desse tipo de doença, tem-se buscado desenvolver técnicas que visam o restabelecimento do equilíbrio entre o patógeno e os microrganismos residentes do solo, que sejam adaptados ao mesmo nicho ecológico (POSTMA e RATTINK, 1992; ALABOUVETTE *et al.*, 1993; ALABOUVETTE, 1999). Os solos dispõem de uma grande variedade de microrganismos com papel fundamental na sanidade e produtividade das plantas, bem como na preservação de múltiplas funções no ecossistema, como interações dentre e entre comunidades microbianas: sinergismo, mutualismo, antagonismo, parasitismo e competição por espaço, nutrição e sitio de infecção (DUFFY *et al.*, 2003).

Solos supressivos ocorrem naturalmente e são um bom exemplo de equilíbrio e de controle biológico na natureza, sendo sítios indicados para a

seleção de potenciais agentes de biocontrole (ALABOUVETTE, 1999). A supressividade em solos agrícolas a patógenos de plantas tem se manifestado por meio da supressão geral, que envolve a biota microbiana total do solo e não é transferível entre os solos, e da supressão específica que envolve o efeito individual ou seletivo de grupos de microrganismos e é transferível (WELLER *et al.*, 2002; DUFFY *et al.*, 2003).

Muitos grupos de microrganismos, como actinomicetos, espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Fusarium*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Clostridium* e *Bacillus*, têm sido reconhecidos pelo seu papel na supressividade de murchas causadas por *Fusarium* em várias culturas (ALABOUVETTE, 1990; LANDA *et al.*, 2002b). Entretanto, os resultados práticos mais consistentes e promissores foram encontrados com isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (avirulentos ou hipovirulentos), de *Trichoderma spp.* e de espécies fluorescentes de *Pseudomonas* (ALABOUVETTE, 1990; ALABOUVETTE *et al.*, 1993; LARKIN *et al.*, 1996; HERVAS *et al.*, 1998; DUIJFF *et al.*, 1999; SNEH, 1999).

Em estudos em casa de vegetação, a inoculação prévia com isolados não-patogênicos de *F. oxysporum* protegeu plantas de repolho, cravo, linho, melancia e tomate contra a murcha-vascular (DAVIS, 1967, 1968). O cultivo de cravo em solo infestado com isolados não-patogênicos de *F. oxysporum* induziu atraso no aparecimento de sintomas, resultando em menores perdas, as repetições de estudos no tempo e no espaço resultaram em vários graus de supressão da doença (POSTMA e RATNIK, 1992; POSTMA e LUTTIKHOLT, 1993). Espécies de *Trichoderma* protegeram plantas de tomate, cravo e gergelim contra a murcha-vascular quando usados isoladamente ou em conjunto com espécies fluorescentes de *Pseudomonas* (KARUNANITHI e MOHAMED, 1999; MISHRA *et al.*, 2000). Isolados de *Pseudomonas spp.* utilizados no tratamento de sementes suprimiram murchas de *Fusarium sp.* como resultado do estímulo direto da planta, inibição de patógenos e, ou indução de mecanismos de defesa da planta a patógenos em culturas como cravo, ervilha, milho e rabanete (DUIJFF *et al.*, 1993; LEEMAN *et al.*, 1996; BOTELHO *et al.*, 1998; LANDA *et al.*, 2002a).

Resultados similares ou até melhores, também foram encontrados com o uso desses bioagentes isoladamente ou em conjunto em muitos outros ecossistemas e culturas, como linho (LEMANCEAU e ALABOUVETTE, 1991, 1993), tomate (LOUTER e EDGINTON, 1990), aipo (SCHNEIDER, 1984), pepino (MANDEEL e BAKER, 1991), grão-de-bico (HERVÁS *et al.*, 1995), batata-doce (KOMADA, 1990); manjeriço (MINUTO *et al.*, 1994), ciclâmen (MINUTO *et al.*, 1995), cravo (POSTMA e RATTINK, 1991; POSTMA e RATTINK, 1992; LEMANCEAU *et al.*, 1992.), rabanete (LEEMAN, *et al.*, 1995; RAAIJMAKERS *et al.*, 1995) e aspargo (REID *et al.*, 2002).

Os principais mecanismos de supressão da murcha-vascular por agentes de biocontrole são a competição por espaço, por ferro e carbono na rizosfera limitando o crescimento saprofítico do patógeno (ALABOUVETTE *et al.*, 1984; CUGUDDA e GARIBALDI, 1987) e por sítio de infecção nas raízes (SCHNIEDER, 1984; MANDEEL e BAKER, 1991). Acredita-se também que a colonização por *F. oxysporum* não-patogênico induza resistência contra a *forma specialis* patogênica (BILES e MARTYN, 1989; KOMADA, 1990; DUIJFF *et al.*, 1998; SNEH, 1999). Na maioria destes estudos, a infestação do solo com a forma não-patogênica foi feita algum tempo antes da infestação com a *forma specialis*. Isso contraria o que ocorre na natureza, onde a forma patogênica está usualmente bem instalada e estabelecida. Tratamento de sementes com clamidósporos de formas não-patogênicas e plantio em solo infestado com alta concentração da forma patogênica resultaram em atraso no aparecimento de sintomas (COELHO NETTO, 1998).

Um dos receios dos cientistas é a transferência de gene de patogenicidade da *forma specialis* existente no solo para a forma não-patogênica introduzida para combatê-la, caso haja compatibilidade vegetativa entre elas. GULLINO *et al.* (1995) e ALVES-SANTOS *et al.* (1999) verificaram que trocas genéticas não ocorreram entre *F. oxysporum*, antagonista introduzido, e os isolados patogênicos existentes no solo e que, embora a possibilidade das trocas genéticas não possa ser excluída, as evidências foram suficientes para considerar que a introdução desse

antagonista em um agroecossistema produz riscos mínimos. No Brasil, COELHO NETTO (1998) e COELHO NETTO e DHINGRA (1999), demonstraram que 60 isolados não-patogênicos de *F. oxysporum* endofíticos, obtidos das raízes de feijão, não foram compatíveis com nenhum dos 20 isolados de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* coletados de diferentes regiões agro-ecológicas do Brasil, mas que todos os 20 isolados do patógeno foram compatíveis vegetativamente entre si. Esse resultado demonstra que as duas formas de *F. oxysporum* são geneticamente distintas, tornando improvável a transferência dos genes de patogenicidade das formas patogênicas para as formas não-patogênicas.

O sucesso da colonização competitiva do substrato por um fungo de solo depende de três fatores: a habilidade saprofítica competitiva do fungo, os componentes do inóculo, densidade e potencial, e as condições ambientes (GRIFFIN, 1972). Estudos têm sido realizados para entender a dinâmica da densidade de inóculo no solo e, especialmente, a importância da fase saprofítica no ciclo biológico do patógeno, bem como fatores ecológicos inter-relacionando densidade de inóculo, microflora, planta hospedeira e severidade da doença (SHIPPERS e GAMS, 1979).

O agente causal da murcha-vascular do feijoeiro é um patógeno habitante do solo, cujas medidas de controle convencionais têm apresentado limitações. Sendo a densidade de inóculo um fator crucial para o progresso da doença, sugere-se o controle biológico, com microrganismos específicos ou grupos de microrganismos, visando à redução do inóculo no solo e, conseqüentemente, atraso do aparecimento dos sintomas, redução da disseminação da doença e da taxa de progresso da doença. Além disso, o controle biológico pode proporcionar formação de barreiras biológicas que impedem a chegada do inóculo do patógeno ao sítio de infecção da planta.

O presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial de uso do controle biológico no patossistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*/feijão a partir das seguintes etapas:

1. Selecionar um isolado de *F. oxysporum* não-patogênico, um isolado de *Trichoderma* sp. e outro de *Pseudomonas* fluorescentes mais competentes e com alta competitividade rizosférica.

2. Estudar o efeito do tratamento de sementes de feijão com isolados selecionados de *Pseudomonas* fluorescentes, no desenvolvimento da murcha-vascular.

3. Estudar a relação entre a densidade de inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* e de *F. oxysporum* não-patogênicos adicionada no solo para supressão da forma patogênica.

4. Estudar, em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, o efeito combinado de sementes de feijão tratadas com a bactéria e plantadas em solo infestado com *F. oxysporum* não-patogênico em casa de vegetação, no desenvolvimento da murcha-vascular.

5. Estudar, em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, o efeito combinado de sementes de feijão tratadas ou não-tratadas com a bactéria e plantadas em solo infestado com *F. oxysporum* não-patogênico ou *Trichoderma* sp. e o efeito de cada potencial antagonista sozinho, no campo, no desenvolvimento da murcha-vascular.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Procedimento geral

Os ensaios em casa de vegetação envolveram o uso de vasos de plástico com capacidade para 3,5kg de solo e de tubetes com capacidade para 60g de solo. Os tubetes tinham uma fenda lateral, o que permitiu a retirada do sistema radicular intacto das plantas. Os substratos utilizados para cultivo de plantas de feijão foram: a) para estudos iniciais de seleção, vermiculita peneirada (>20 mesh) e esterilizada, b) para os demais estudos, mistura de solo natural (solo coletado de um campo não cultivado), peneirado (peneira de 10 mm), areia e esterco (2:1:0,5 v:v:v), suplementado com superfosfato simples (300 mg/kg de substrato).

A infestação do solo com clamidósporos de *Fusarium oxysporum* patogênico ou não, foi feita utilizando um misturador mecânico de braço duplo, onde foram colocados simultaneamente o solo e a quantidade necessária de inóculo. O tempo de mistura variou de três a seis horas, dependendo da quantidade de solo no misturador (quanto maior a quantidade de solo, maior o tempo de mistura). Decorrido o tempo de mistura, foi tirada uma amostra do misturador, para determinação da densidade de inóculo (DI) utilizando-se a técnica de diluição em série em meio seletivo para cada fungo (DHINGRA e SINCLAIR, 1995). Caso o solo

não atingisse a DI desejada, era adicionado mais inóculo e o processo de mistura era repetido até atingir-se a DI desejada.

O cultivar de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) usado em todos os ensaios foi o IPA-06, do grupo carioquinha, suscetível à murcha-vascular (COSTA, 1999).

2.2. Microrganismos utilizados no trabalho

2.2.1. Isolados fúngicos

Foram usados os isolados FO1, FO2 e FO3, de formas não-patogênicas de *Fusarium oxysporum* (FO) e um patogênico mutante de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* resistente a benomil (FOPm) obtidos por COELHO NETTO (1998), que se encontram armazenados na Clínica de Doenças de Plantas. Além desses, utilizaram-se também isolados de *Trichoderma* spp. (TR1, TR2, TR3, TR4, TR5, TR6, TR7, TR8, TR9, TR10, TR11) que se encontram também disponíveis na Clínica de Doenças de Plantas.

2.2.2. Isolados bacterianos

Isolados de *Pseudomonas* fluorescentes (PF) foram obtidos da rizosfera, rizoplano e de tecido interno (endofíticas) de plantas de feijão coletadas de vários locais, na região de Viçosa, MG. Para isso, o sistema radicular das plantas mais vigorosas foi coletado de preferência após o estágio de maturação. As plantas foram arrancadas, tomando cuidado para que não ocorresse perda excessiva de raízes. O excesso de solo foi retirado, a parte aérea da planta foi descartada e o sistema radicular acondicionado em saco plástico e levado para a Clínica de Doenças de Plantas.

Para o isolamento de bactérias da rizosfera, foi retirado o solo da rizosfera com auxílio de um pincel seco. O solo foi colocado em um becker contendo 100mL de solução salina e mantido por 24 horas em agitador. A

suspensão do solo assim obtida foi diluída até 10^{-6} e retirou-se 1 mL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} que foi espalhado em placas de Petri com auxílio de alça de Drigalski. As placas continham meio King-B no qual adicionou-se, anteriormente, uma suspensão de conídios de FOPm (2×10^4 conídios/mL) (SIMON e RIDGE, 1974). As placas foram mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12 h. Após 24 horas foi observado, sob luz ultravioleta próximo (NUV), o aparecimento de colônias bacterianas fluorescentes com algum indício de inibição de crescimento de FOPm. Estas colônias foram retiradas e transferidas para meio King-B em tubos e armazenadas sob refrigeração para uso posterior.

O isolamento de bactérias do rizoplano foi feito das mesmas raízes usadas para rizosfera. As raízes intactas foram agitadas em 100mL de solução salina por 24 horas. A suspensão assim obtida foi diluída e nos passos seguintes seguiu-se o mesmo procedimento descrito para bactérias da rizosfera.

Após o isolamento de bactérias da rizosfera e do rizoplano, as mesmas raízes foram lavadas em água corrente, desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito de sódio (0,6% de cloro ativo), por dois minutos, lavadas com água esterilizada e trituradas em liquidificador contendo 100 mL de solução salina para obtenção das bactérias endofíticas. Os passos seguintes seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente. Os isolados foram repicados para meio King-B em tubos e armazenados sob refrigeração para uso posterior.

2.3. Produção de inóculo e infestação do solo

Para a infestação do solo, os clamidósporos de cada isolado de *F. oxysporum* foram produzidos da seguinte maneira: inicialmente o fungo foi cultivado por oito dias em meio líquido de batata-sacarose (BS), em frascos erlenmeyer, sob agitação contínua. Aliquotas de 10 mL dessa cultura foram transferidas assepticamente para frascos contendo mistura esterilizada de vermiculita-BS (4 mL de BS/g de vermiculita). Os frascos foram mantidos a

temperatura ambiente, com agitação periódica para permitir a colonização uniforme do substrato. Após 25 dias de incubação, os conteúdos dos frascos foram transferidos para bandejas plásticas e espalhados com uma espátula. As bandejas foram cobertas com papel jornal e deixadas a temperatura ambiente para secagem lenta. Após 15 dias a cultura seca de *Fusarium* foi misturada com solo peneirado e esterilizado. Após quantificação de unidades formadoras de colônias de FOPm ($4,8 \times 10^5$ UFC/g de solo), FO1 ($2,6 \times 10^6$ UFC/g de solo), FO2 ($1,7 \times 10^6$ UFC/g de solo) e FO3 ($3,95 \times 10^6$ UFC/g de solo) as culturas foram armazenadas em embalagens plásticas e mantidas em condição ambiente. Esta mistura serviu de inóculo estoque para todos os estudos. Em todos os experimentos a concentração de FOPm utilizada foi de 5×10^3 clamidósporos/g de solo, determinada em ensaios preliminares.

O inóculo dos isolados de *Trichoderma* spp., para uso em laboratório e casa de vegetação, foi produzido em Batata-Dextrose-Agar (BDA) em placas de Petri a 25°C com fotoperíodo de 12h. Para ensaios no campo, inóculo estoque foi produzido em arroz umedecido com Batata-Dextrose e autoclavado obtendo a concentração de 4×10^7 conídios/g de arroz.

O inóculo de isolados bacterianos foi produzido no meio King-B em placas de Petri, a 25°C por 48 horas e a suspensão bacteriana para os estudos foi preparada em solução salina esterilizada. A concentração de células bacterianas foi ajustada com auxílio de um espectrofotômetro para 10^8 células/mL.

2.4. Competitividade “*in vitro*” de fungos e antibiose de bactérias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Para determinar-se a competitividade *in vitro* de isolados de FO e de TR, em relação a FOPm foi usado o método descrito por POSTMA e LUTTIKHOLT (1993). Discos de 5mm da cultura de FOPm crescendo em BSA e do isolado candidato a competidor foram colocados em pontos

opostos de placas de Petri contendo BSA, as quais foram mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12h. A testemunha consistiu de placas contendo somente um dos fungos testados. Aos cinco e aos oito dias após a incubação, mediu-se, com auxílio de um transferidor, o ângulo de crescimento da colônia do isolado competidor. No caso de isolado de *Trichoderma* as culturas foram incubadas por mais 10 dias para verificar se o antagonista testado colonizava o micélio de FOPm. Cinco repetições foram usadas para cada dupla de fungos, e os resultados foram expressos como a média dos ângulos de crescimento das colônias.

A antibiose dos 150 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes (PF) a FOPm foi determinada colocando-se um disco de micélio do FOPm no centro da placa de Petri contendo meio King-B e dois isolados diferentes de PF foram semeados em pontos opostos da placa. Após oito dias a 25°C com fotoperíodo de 12h, observou-se halos de inibição de crescimento de FOPm. Nessa etapa, foram selecionados os isolados que limitaram o crescimento das colônias de FOPm.

2.5. Competência rizosférica de *F. oxysporum* não-patogênicos e de bactérias

2.5.1. *F. oxysporum* não-patogênicos

A competência rizosférica dos isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos foi determinada em casa de vegetação. O solo utilizado foi autoclavado durante duas horas por dois dias consecutivos. Tubetes foram preenchidos com solo autoclavado e infestado com clamidósporos de FO1 (2,3 g de inóculo/300 g de solo = quantidade de solo necessária para preencher cinco tubetes), FO2 (3,5 g de inóculo/300 g de solo) e FO3 (1,5 g de inóculo/300 g de solo), na concentração de 2×10^4 clamidósporos/g de solo para cada um dos três isolados. Como testemunha utilizaram-se tubetes preenchidos apenas com solo autoclavado. Foi semeada uma semente de feijão em cada tubete. Os tubetes foram distribuídos aleatoriamente no seu

suporte e foram irrigados diariamente. Após atingirem o estágio fenológico V2, as plantas foram retiradas dos tubetes com raízes intactas. Após a remoção do solo aderido à raiz, com o auxílio de um pincel, as raízes foram montadas em placas de Petri (Figura 1) contendo meio GNA (Galactose-Nitrato-Ágar), seletivo para *Fusarium* (DHINGRA e SINCLAIR, 1995) e mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12h. Após cinco dias, mediu-se o comprimento da raiz colonizada pelo fungo, e foi calculado o percentual de raiz colonizada. Os resultados foram expressos como média do percentual de raiz colonizada por FO em cinco plantas.



Figura 1 - Raízes de feijoeiro cultivado em solo infestado com *F. oxysporum* não-patogênico (B) e em solo estéril (A) e montadas em placas de Petri contendo meio GNA.

2.5.2. Bactérias

A competência rizosférica dos isolados bacterianos foi primeiramente estudada em vermiculita esterilizada. A vermiculita em tubetes foi umedecida com água estéril até o ponto de encharcamento. As sementes de feijão foram tratadas com cada isolado de PF por imersão em suspensão bacteriana (10^8 cel/mL), por uma hora, e uma semente foi plantada em cada tubete. Os tubetes semeados foram distribuídos aleatoriamente numa “caixa-de-raiz”. A “caixa-de-raiz” (DHINGRA e

SINCLAIR, 1995) consistiu em um aparato desenvolvido com o objetivo de manter o ambiente do solo saturado de umidade na zona radicular, enquanto a parte aérea da planta mantém-se exposta ao ambiente, não necessitando de rega. Os tubetes em “caixa-de-raiz” foram mantidos em câmara de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Após oito dias foi determinada a emergência das plântulas e após atingirem o estágio fenológico V2, as plantas foram retiradas dos tubetes mantendo-se o sistema radicular intacto e livre de vermiculita. Para determinar a proporção de rizosfera colonizada por cada isolado de PF, foi feita uma impressão do sistema radicular (Figura 2) no meio King B contido em placas de Petri de 15 cm de diâmetro. Após 24h de incubação a 25°C com fotoperíodo de 12h, foi medido o comprimento de raiz colonizado com colônias bacterianas fluorescentes. O percentual de raiz colonizado foi calculado em função do comprimento total da raiz. Também foi observada a parte das raízes colonizada por PF (base, meio ou ponta da raiz) para cada isolado. Nas testemunhas as sementes foram imersas apenas em água estéril.

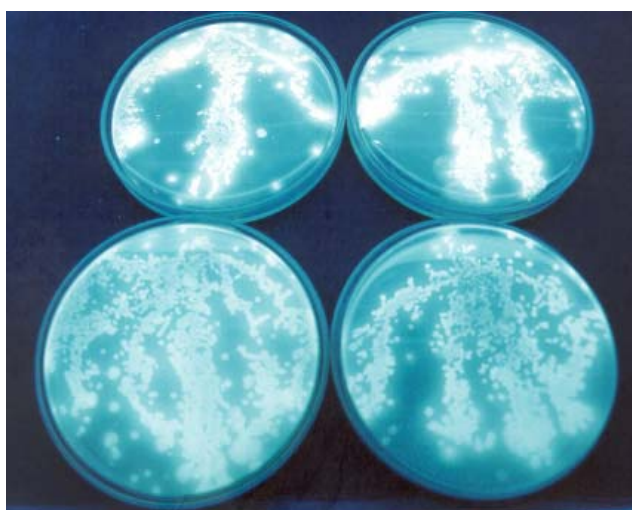


Figura 2 - Impressão do sistema radicular de feijoeiro oriundo de sementes tratadas com *Pseudomonas sp.* fluorescentes em placas de Petri contendo meio King B.

2.6. Competitividade rizosférica de fungos e de bactérias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

2.6.1. Ensaio 1 - Competitividade rizosférica de *F. oxysporum* não-patogênicos e contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

A competitividade rizosférica de cada isolado de FO e em relação ao FOPm foi determinada em solo natural em casa de vegetação. Uma semente de feijão foi plantada em cada um de cinco tubetes com solo natural uniformemente infestado com clamidósporos de cada isolado FO (2×10^4 clamidósporos/g de solo) individualmente ou junto com FOPm (5×10^3 clamidósporos/g de solo). Os tubetes foram irrigados diariamente. Para obter essas concentrações foram utilizadas respectivamente as seguintes quantidades do inóculo estoque: FO1 - 2,3 g de inóculo/300 g de solo, FO2 - 3,5 g de inóculo/300 g de solo, FO3 - 1,5 g de inóculo/300 g de solo, FOPm - 3,12 g de inóculo/300 g de solo. A testemunha consistiu de solo com ou sem infestação por FOPm. Após atingirem o estágio fenológico V2, as plantas foram retiradas dos tubetes, tendo-se o cuidado de manter o sistema radicular intacto. O excesso de solo aderido às raízes foi eliminado e as raízes com solo da rizosfera, de cada repetição separadamente, foram agitadas em frascos com água estéril por duas horas. A suspensão do solo obtida de 1g de solo foi diluída em série até 10^{-3} . Tomou-se 1 mL desta suspensão na diluição de 10^{-3} (FO não-patogênico) e 10^{-2} (FO não-patogênico/FOPm) que foi transferida para placas de Petri com meio GNA para FO e em GNA-benomil (Galactose-Nitrato-Ágar acrescido 10mg/L de benomil) para FOPm. As placas foram mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas para determinar-se a colonização rizosférica. Para determinar-se a colonização interna de raízes por FO utilizou-se a técnica descrita por COELHO NETO E DHINGRA (1999). Uma amostra de 1g de raízes foi triturada em liquidificador com 100 mL de água, retirou-se uma alíquota de 1 mL desta suspensão e foi feita uma diluição em série até 10^{-3} (FO não-patogênico) e 10^{-2} (FO não-patogênico/FOPm), então se procedeu a mesma metodologia descrita acima. A outra parte dessas raízes foi montada em

placas de Petri de 15 cm contendo GNA ou GNA-benomil e mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, a fim de verificar a localização das colônias do respectivo isolado no sistema radicular. Os isolados foram classificados de acordo com a quantidade de UFC na rizosfera e na parte interna da raiz.

2.6.2. Ensaio 2 - Determinação da concentração de *F. oxysporum* não-patogênicos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Para determinar-se a concentração de FO mais adequada na restrição da infecção de plantas de feijão por FOPm utilizou-se solo natural infestado com clamidósporos de FOPm (3,12 g de inóculo/300 g de solo). Este solo depois foi infestado com clamidósporos do respectivo isolado de FO nas concentrações de 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 e 5×10^4 clamidósporos/g de solo. Para obter essas concentrações foram utilizadas respectivamente as seguintes quantidades do inóculo estoque: FO1 - 2,3; 3,4; 4,6 e 5,7 g de inóculo/300 g de solo, FO2 - 3,5; 5,2; 7,0 e 8,8 g de inóculo/300 g de solo, FO3 - 1,5; 2,2; 3,0 e 3,7 g de inóculo/300 g de solo. A testemunha consistiu de solo com e sem infestação com FOPm. O restante do procedimento foi similar ao descrito acima, exceto que neste ensaio foi determinado apenas a colonização interna das raízes por FOPm utilizando-se a técnica descrita por COELHO NETO E DHINGRA (1999).

2.6.3. Ensaio 3 - Competitividade rizosférica de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

A competitividade de 11 isolados de *Trichoderma* em relação a FOPm foi estudada utilizando-se método semelhante ao acima. O solo foi infestado com clamidósporos de FOPm e com conídios de cada um dos isolados de *Trichoderma* (2×10^4 conídios/mL), sendo aplicados por meio de 10 mL da suspensão/300 g de solo. Para determinar-se a proporção do sistema radicular colonizado por *Trichoderma*, uma parte dessas raízes foi

esterilizada superficialmente, montadas no meio de arroz 10% (seletivo para *Trichoderma*) em placa de Petri de 15 cm de diâmetro que foram mantidas a 25°C, seguindo-se metodologia descrita para FO. Para quantificar as unidades formadoras de colônias de *Trichoderma* e FOPm nas raízes o restante das raízes foram desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio e trituradas, em liquidificador com 100 mL de água esterilizada. Retirou-se uma alíquota de 1 mL desta suspensão e foi feita uma diluição em série até 10^{-4} . Tomou-se 1 mL desta suspensão na diluição de 10^{-4} que foi transferida para placas de Petri com meio de arroz 10%. As placas foram mantidas a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. A seleção do isolado de *Trichoderma* mais competitivo foi baseada no número de UFC de *Trichoderma* formados e no crescimento deste sobre a colônia de FOPm. O isolado selecionado foi mantido em sílica gel para estudos posteriores.

2.6.4. Ensaio 4 - Competitividade rizosférica de bactérias

Para avaliar-se a competitividade rizosférica dos isolados bacterianos (PF2, PF7, PF12, PF14, PF15, PF16, PF21, PF22) selecionados no ensaio de competência rizosférica, as sementes de feijão foram tratadas com o respectivo isolado, como descrito anteriormente, e sementes não-tratadas (testemunha), foram plantadas em solo natural contido em tubetes. Os tubetes foram distribuídos aleatoriamente na “caixa-de-raiz” e mantidos em câmara de crescimento a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Cinco dias após a emergência (estádio fenológico V1), as plântulas foram retiradas dos tubetes, mantendo-se o sistema radicular intacto. Após a retirada do excesso de solo, foi feita a impressão das raízes em placas de Petri contendo meio King B para determinar o percentual e a localização da colonização por PF na rizosfera como descrito anteriormente.

2.6.5. Ensaio 5 - Competitividade rizosférica de bactérias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

O efeito competitivo dos isolados bacterianos (PF14, PF16, PF22) selecionados baseando-se na competência e competitividade rizosférica nos ensaios anteriores, em relação a FOPm foi determinado em solo infestado com FOPm, utilizando a mesma metodologia descrita em 2.6.4, mas em casa de vegetação e com irrigação diária. Após atingirem o estágio fenológico V2, as plantas foram retiradas dos tubetes, com o máximo de sistema radicular intacto. As raízes foram lavadas em água corrente, desinfestadas superficialmente, lavadas em água esterilizada e montadas em GNA-benomil em placas de Petri. As placas foram mantidas a 25°C para localizar o ponto de infecção por FOPm. Parte das raízes foram usadas para quantificar o FOPm dentro das raízes como descrito anteriormente. Os isolados foram selecionados baseando-se na menor quantidade de UFC de FOPm e sua localização no sistema radicular das plantas.

2.7. Efeito individual e conjunto de microrganismos na supressão da murcha-vascular em casa de vegetação e campo

2.7.1. Efeito individual

Num primeiro estudo determinou-se o efeito individual de isolados de FO e de PF em reduzir a murcha-vascular durante o ciclo de feijão em casa de vegetação.

Nos estudos conduzidos em casa de vegetação, o solo foi infestado com FOPm adicionando-se 137,0 g de inóculo estoque/13 kg de solo (quantidade de solo usada para encher quatro vasos de 3,5 kg). Foram adicionados 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 e 5×10^4 clamidósporos/g de solo dos isolados FO1, FO2 e FO3. Para obter-se essas concentrações, respectivamente, utilizaram-se as seguintes quantidades de inóculo estoque: FO1 - 100,7; 151,0; 202,0 e 252,0 g de inóculo/13 kg de solo, FO2 - 154,0;

231,0; 308,0 e 385,0 g de inóculo/13 kg de solo, FO3 - 66,0; 100,0; 133,0 e 166,0 g de inóculo/13 kg de solo. Testemunhas consistiram de solo natural livre do patógeno e solo infestado somente com FOPm. Em cada vaso foram plantadas quatro sementes. Após a emergência das plantas foi feito o desbaste mantendo apenas duas plantas por vaso. A infecção das plantas foi aferida indiretamente pela avaliação na mudança de teores de clorofila nas folhas e foram acompanhadas a partir do estágio fenológico R6 (floração-primeira flor) com intervalos de oito dias, até o estágio R9 (maturação fisiológica). De cada planta em um vaso foram retirados três fragmentos de 2 cm² da primeira folha trifoliolada e os fragmentos de ambas as plantas foram misturados obtendo assim uma amostra composta por vaso. Os fragmentos foram imediatamente colocados em etanol 80%, em vidros escuros e levados ao laboratório para a determinação da clorofila A, B e total. Determinou-se a clorofila seguindo método descrito por LICHTHENTHALER (1987). A produtividade por vaso foi determinada no estágio R9, obtendo-se o número de vagens e a matéria seca dos grãos por vaso.

Num outro conjunto similar de vasos aos do primeiro estudo foi avaliada a severidade da murcha-vascular após o surgimento dos sintomas (início do estágio R8), utilizando uma escala de notas (Tabela 1) desenvolvida pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT (1990).

Tabela 1 - Escala para avaliação da severidade da murcha-vascular em feijoeiros no estágio de floração (CIAT, 1990).

Grau	Aspectos da planta
1	Sem sintomas da doença.
2	Ausência de murcha e presença de leve escurecimento vascular, limitado aos tecidos da base do caule.
3	Escurecimento vascular médio, clorose e murcha de até 25% das folhas.
4	Escurecimento vascular intenso, clorose, necrose e queda de folhas, murcha de até 50% das folhas e nanismo.
5	Plantas mortas ou com mais de 50% das folhas murchas, clorose, necrose, desfolhamento e nanismo severos.

Para PFs, foram usadas as sementes tratadas por uma hora na suspensão bacteriana do respectivo isolado (PF14, PF16 e PF22). Testemunhas consistiram de sementes imersas em água estéril. O plantio e avaliação da severidade da doença seguiram a mesma metodologia descrita acima para FO.

2.7.2. Efeito conjunto em casa de vegetação

Para determinar o efeito conjunto de FO e de PF foram escolhidos os isolados FO3 de *F. oxysporum* não-patogênico e o PF22 de *Pseudomonas*, em função dos resultados obtidos com esses isolados nos ensaios anteriores. Solo infestado com FOPm (137,0 g de inóculo estoque/13 kg de solo) foi infestado posteriormente com FO3 com 66,0 g de inóculo estoque/13 kg de solo para obter-se a concentração final de 2×10^4 clamidósporos/g de solo e foram plantadas sementes de feijão tratadas com o isolado PF22 de *Pseudomonas* fluorescentes. As testemunhas consistiram de sementes não-tratadas e tratadas com PF22, plantadas em solo contendo apenas FOPm. O acompanhamento de mudanças na clorofila A, B e total iniciou-se a partir do estágio R6 com intervalo de oito dias até o estágio R9, quando também determinou-se o número de vagens e a matéria seca dos grãos produzidos.

2.7.3. Efeito conjunto no campo

O mesmo ensaio foi repetido no campo. Para isso foi criado um infectário (sick-plot) de 156m² utilizando-se o FOPm. O processo de preparação deste infectário durou um ano e consistiu de repetidas aplicações de inóculo de FOPm e plantios de feijão, cujas plantas eram posteriormente incorporadas ao solo. No final do processo havia incidência uniforme da doença. A densidade de inóculo de FOPm variou entre 700 e 1000 UFC/g de solo.

O experimento no infectário foi montado entre dezembro de 2003 e março de 2004. A área foi dividida em três blocos com espaçamento de 1,0m entre si, cada um com seis parcelas de 3,0x1,70m, com espaço entre parcelas de 0,60 cm. Para diminuir a interferência entre as parcelas foram feitos drenos em volta de cada parcela para escoamento superficial de água das chuvas. Duas parcelas em cada bloco foram infestadas com 877 g de inóculo estoque de FO3/parcela, para obter a concentração de $3,4 \times 10^3$ clamidósporos/g de solo ou com 510 g de inóculo estoque de TR11/parcela, para obter a concentração de 2×10^4 conídios/g de solo; três parcelas serviram como testemunhas negativas. Sementes de feijão tratadas ou não-tratadas com PF22 foram plantadas em parcelas que receberam FO3 ou *Trichoderma*. Assim foram obtidas parcelas apenas com FO ou junto com PF, apenas com *Trichoderma* ou junto com PF. O ensaio de campo consistiu de cinco tratamentos, cada qual representado por quatro fileiras de feijão com trinta sementes por fileira.

Aos cinco dias após o plantio foi quantificado o percentual de germinação para cada parcela. As mudanças na clorofila A, B e total foram acompanhadas a partir do estágio R6 até R9 como descrito anteriormente. Para a avaliação de cada parcela foram marcadas três plantas centrais em cada uma das duas fileiras internas. Do folíolo central da primeira folha verdadeira de cada planta marcada, dentro da fileira, foi retirado um disco de 2 cm^2 com um furador, e discos obtidos de cada planta foram misturados para obter uma amostra composta. O procedimento foi repetido para a segunda fileira e assim foram obtidas duas amostras para cada parcela. No estágio R9 foram determinados a incidência da murcha-vascular, o número de vagens e o peso da matéria seca dos grãos para cada parcela.

2.8. Análise estatística

Nas análises estatísticas empregou-se o programa SAS (The SAS System, Version 8.0, NC, Estados Unidos). Efetuou-se análise de variância e

comparação das médias utilizando-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com os valores da clorofila A, B e total obteve-se a Área Abaixo da Curva de Decréscimo da Clorofila (AACDCL). Os valores de AACDCL foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os valores de severidade foram previamente transformados, para efeito de análise estatística, calculando-se o Índice de Doença (ID), pela fórmula sugerida por McKINNEY (1923).

2.9. Identificação dos isolados PF22 e TR11

O isolado bacteriano PF22 foi enviado para o Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente – BBMA, onde foi identificado baseando-se nos perfis de ácidos graxos, e os dados foram analisados pelo Sistema Midi, sendo comparados com a biblioteca de referência TSBA 4.0. O isolado em questão foi identificado como sendo *Pseudomonas putida* biotipo A.

O isolado TR11 foi identificado com sendo *Trichoderma harzianum* Rifai, com base na chave de identificação de RIFAI (1969).

3. RESULTADOS

3.1. Microrganismos

Os procedimentos utilizados para o isolamento de rizobactérias fluorescentes permitiram obter 150 isolados bacterianos, dentre os quais 80 isolados foram obtidos da rizosfera de plantas de feijão, 30 isolados do rizoplano e 40 isolados da parte interna das raízes.

3.2. Competitividade “*in vitro*” de fungos e antibiose de bactérias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Os três isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2, FO3) foram similarmente competitivos *in vitro* em relação ao isolado patogênico (FOPm), observado pela limitação do crescimento micelial de FOPm em placas de Petri. A colônia de FOPm sozinha teve um ângulo de crescimento de 293°, enquanto que, em placas com os isolados FO, o ângulo de crescimento de FOPm variou de 118 a 125°.

Também não se observaram diferenças entre os onze isolados de *Trichoderma* testados quanto à competitividade *in vitro*. O ângulo de crescimento da colônia de FOPm foi reduzido de 300° para 72 a 79° em

placas de Petri na presença de isolados TR. Após dez dias, o isolado TR11 foi o único que cresceu sobre a colônia de FOPm.

Dos 150 isolados bacterianos testados *in vitro* quanto à antibiose a FOPm, 22 isolados foram selecionados, sendo, cinco do rizoplano (PF2, PF4, PF7, PF12, PF20), três internos da raiz (PF1, PF3, PF10) e quatorze da rizosfera (PF5, PF6, PF8, PF9, PF11, PF13, PF14, PF15, PF16, PF17, PF18, PF19, PF21, PF22). Estes isolados limitaram o crescimento do fungo patogênico.

3.3. Competência rizosférica de *F. oxysporum* não-patogênicos e de bactérias

3.3.1. *F. oxysporum* não-patogênicos

Os isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos diferiram entre si quanto à capacidade de colonizarem as raízes de feijoeiro. Os isolados FO2 e FO3 colonizaram 80% das raízes, e o isolado FO1 69% (Figura 3).

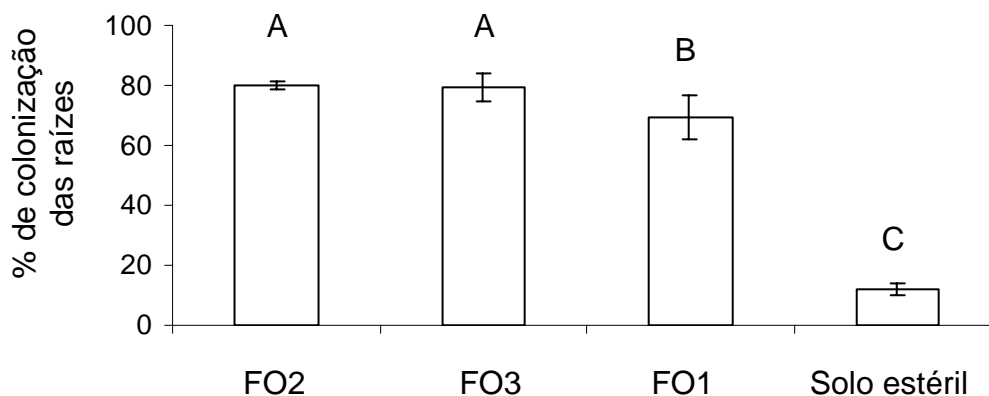


Figura 3 - Percentual de colonização da superfície das raízes de plantas de feijão (estádio fenológico V2) cultivadas em casa de vegetação em tubetes contendo solo estéril e infestado por isolados não-patogênicos de *F. oxysporum* (FO1, FO2 e FO3). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.3.2. Bactérias

Testando-se os 22 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes quanto à sua competência na rizosfera de plantas de feijão cultivadas em tubetes, observou-se que as sementes tratadas com os isolados PF14, PF16 e PF22 tiveram 100% de germinação. Houve diferença significativa entre os isolados quanto ao percentual de colonização da rizosfera/rizoplano, embora tenha ocorrido grande variabilidade quanto ao percentual de colonização para um mesmo isolado. O isolado PF22 foi o que apresentou maior variabilidade de colonização de raízes entre plantas, variando de 23 a 93% da superfície da raiz colonizada e foi o que mais colonizou a rizosfera/rizoplano com uma média de 57% de colonização da raiz, embora não tenha diferido dos isolados PF15, PF14, PF16, PF7, PF2, PF12, PF3, PF21, PF4, PF20, PF13, PF6, PF10, PF8 e PF17 (Figura 4). A colonização do sistema radicular em todos os isolados foi distribuída aleatoriamente em todas as partes das raízes, sem sítio preferencial.

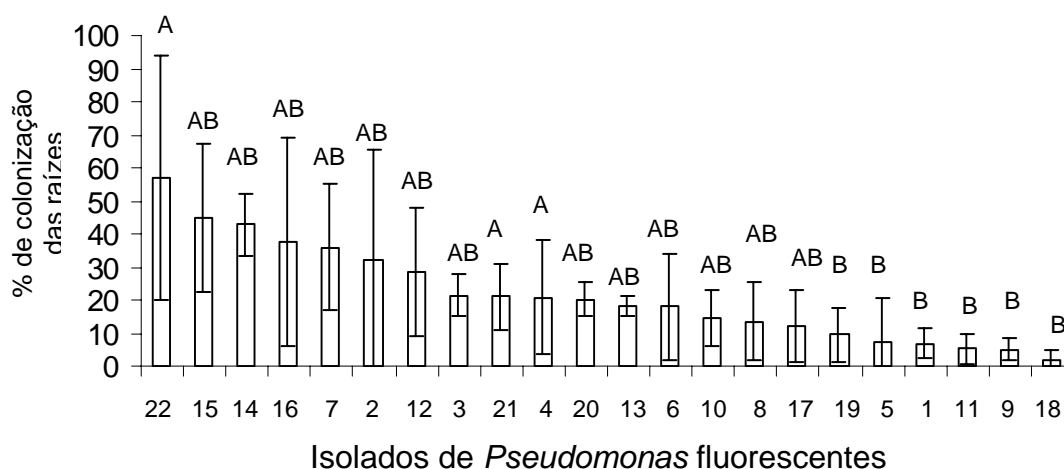


Figura 4 - Percentual da colonização das raízes de plantas de feijão (estádio fenológico V1) oriundas de sementes tratadas com isolados de *Pseudomonas spp.* fluorescentes e cultivadas em tubetes contendo vermiculita estéril, acondicionados em caixa de raiz e mantidos em câmara de crescimento. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.4. Competitividade rizosférica de fungos e de bactérias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

3.4.1. Ensaio 1 - Competitividade rizosférica de *F. oxysporum* não-patogênicos em solo natural e contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Testando-se a capacidade dos isolados FO1, FO2 e FO3 em ocupar a rizosfera de plantas de feijão cultivadas em solo natural, observou-se que o isolado FO3 apresentou uma média de 26×10^{-3} UFC/g de solo, seguido pelos isolados FO2 e FO1, com média de 14×10^{-3} e 6×10^{-3} UFC/g de solo, respectivamente (Figura 5). O isolado FO3 também foi competitivo pelo sítio de colonização das raízes, com uma média de $2,28 \times 10^{-3}$ UFC/g de raiz. Os isolados FO1 e FO2 não diferiram entre si (Figura 6). As colônias de FO concentraram-se nas extremidades das raízes (Figura 1).

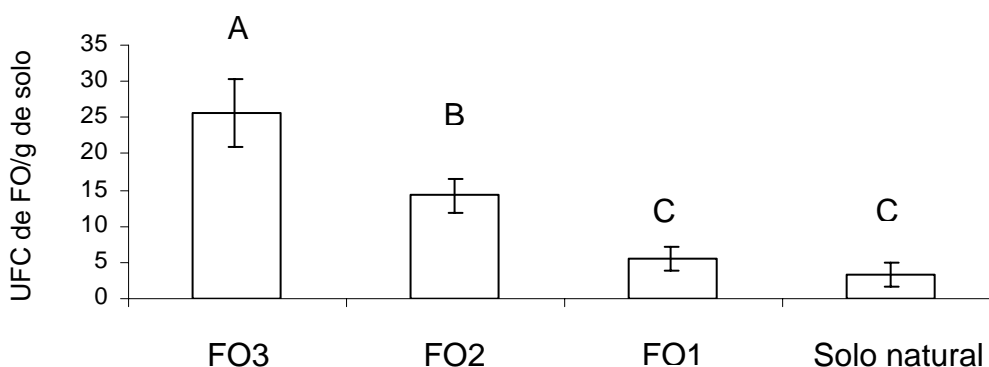


Figura 5 - Unidades formadoras de colônias (UFC), na diluição 10^{-3} , de isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2 e FO3) obtidas da rizosfera de plantas de feijão (estádio fenológico V2) cultivadas em casa de vegetação em tubetes contendo solo natural. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

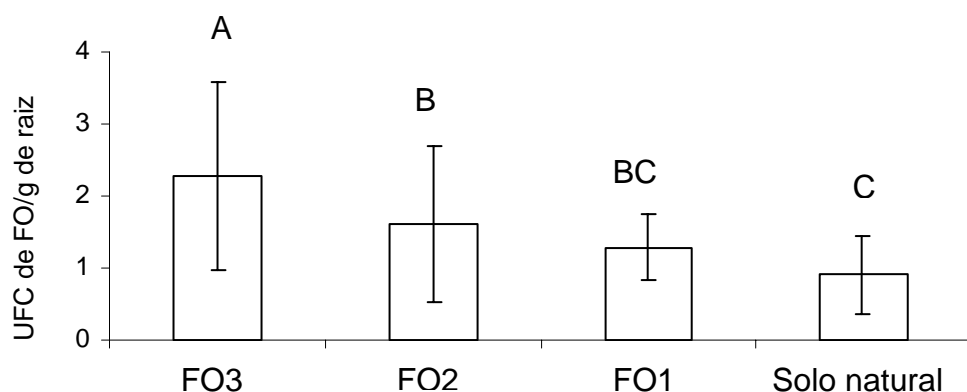


Figura 6 - Unidades formadoras de colônias (UFC) , na diluição 10^{-3} , de isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2 e FO3) obtidas internamente às raízes de plantas de feijão (estádio fenológico V2) cultivadas em casa de vegetação em tubetes contendo solo natural. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

Quando os isolados FO foram testados em solo infestado com FOPm verificou-se que o isolado FO3 foi competitivo em ocupar a rizosfera e o interior das raízes (Figura 7) de plantas de feijão. Este resultado foi evidenciado pela redução da média de UFC de FOPm/g de solo de $9,12 \times 10^2$ para $1,43 \times 10^2$ na rizosfera e de $4,4 \times 10^2$ para $1,0 \times 10^2$ internamente à raiz. Quanto menor a média de UFC de FOPm/g de solo e, ou raiz, mais competitivo foi o isolado não patogênico.

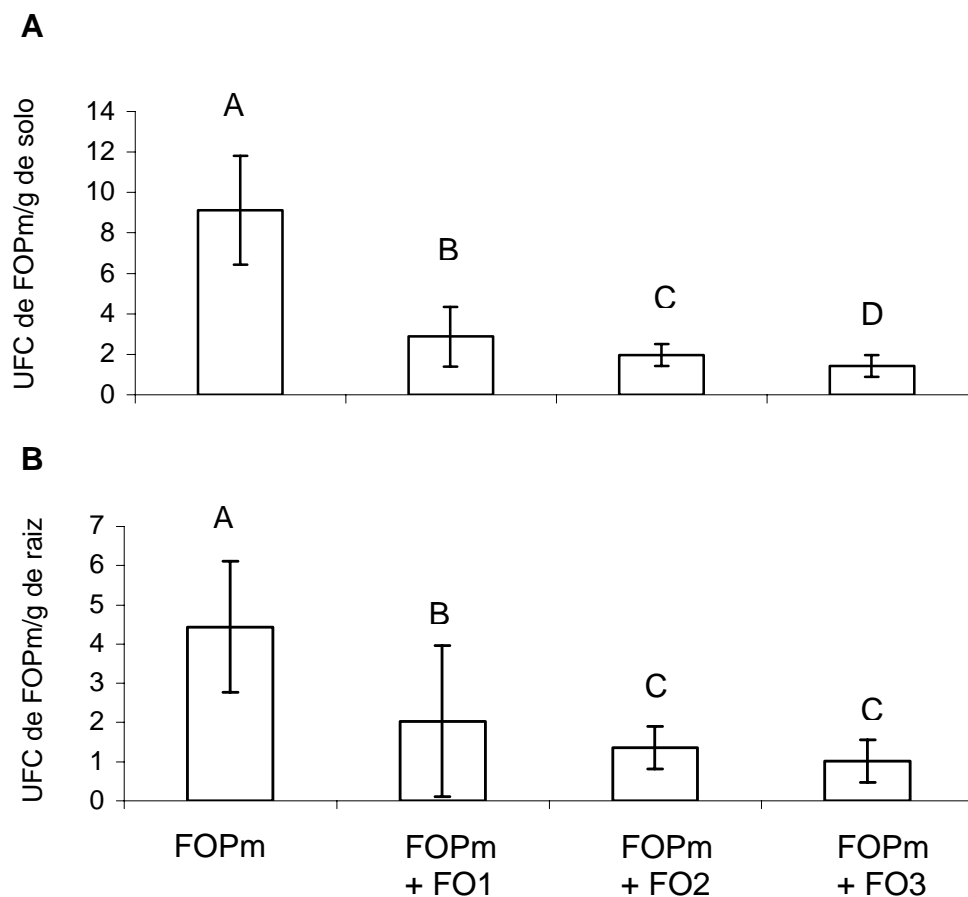


Figura 7 - Unidades formadoras de colônias, na diluição 10^{-2} , de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (UFC de FOPm) obtidas, em GNA-benomil, de solo da rizosfera (A) e da parte interna de raízes (B) de plantas de feijão (estádio fenológico V2) cultivadas em casa de vegetação em tubetes contendo solo natural infestado apenas com FOPm ou simultaneamente com três isolados de *Fusarium oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2 e FO3). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.4.2. Ensaio 2 - Determinação da concentração de *F. oxysporum* não-patogênicos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Verificando-se a concentração de clamidósporos dos três isolados de FO para reduzir a infecção de raízes por FOPm, não houve efeito da concentração para nenhum dos isolados, entretanto houve diferença entre os isolados. Em todas as concentrações houve redução de no mínimo 45% das UFC do patógeno. O isolado FO3 reduziu a média de 11,4 para 1,75 UFC de FOPm/g de raiz (Figura 8).

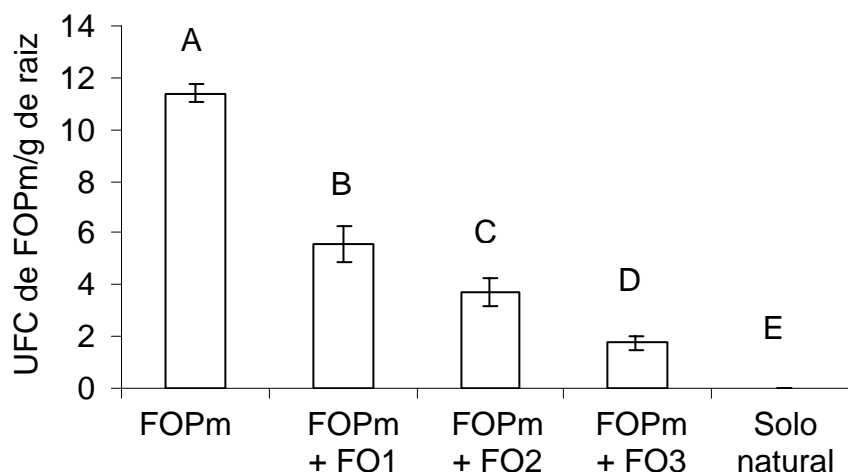


Figura 8 - Unidades formadoras de colônias, na diluição 10^{-2} , de *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (UFC de FOPm/g de raiz) obtidas internamente de raízes de plantas de feijão (estádio fenológico V2) cultivadas em casa de vegetação em tubetes contendo solo natural infestado simultaneamente com FOPm e com isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2 e FO3). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.4.3. Ensaio 3 - Competitividade por sitio de colonização de *Trichoderma* spp. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

Os isolados de *Trichoderma* testados quanto à competitividade rizosférica não diferiram entre si na percentagem de colonização das raízes de feijão, embora o isolado TR11 tenha colonizado em média 52% das raízes enquanto os demais isolados colonizaram de 24 a 42% do comprimento das raízes. Os isolados TR11, TR7, TR9, TR4, TR6 TR3 e TR10 não diferiram entre si quanto à colonização interna das raízes, apresentando média de 50,4 a 42,8 UFC/g de raiz (Tabela 2). Os isolados TR não diferiram entre si e reduziram em no mínimo 80% a média das UFC de FOPm/g de raiz. O isolado TR11 reduziu a média de UFC do patógeno de 31,6 para 1,6, enquanto os demais isolados reduziram para 1,8 a 6,4 UFC de FOPm/g de raiz.

Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias, na diluição 10^{-4} , de isolados de *Trichoderma* spp. (UFC de TR/g de raiz) obtidas internamente de raízes de plantas de feijão (estádio fenológico V2) cultivadas em casa de vegetação em tubetes contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOPm).

TRATAMENTO	UFC de <i>Trichoderma</i> /g de raiz (*)
TR11+ FOPm	50,4 A
TR7+ FOPm	50,0 A
TR9 + FOPm	47,6 A B
TR4+ FOPm	47,6 A B
TR6+ FOPm	44,2 A B
TR3+ FOPm	44,0 A B
TR10+ FOPm	42,8 A B C
TR2+ FOPm	34,4 B C
TR8+ FOPm	33,4 B C
TR5+ FOPm	29,4 C
TR1+ FOPm	28,8 C
Solo com TR sozinho	13,8 D

* Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F. CV % = 13,74
Valores na coluna (médias de cinco repetições), seguidos pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

3.4.4. Ensaio 4 - Competitividade rizosférica de bactérias

Houve diferença entre os isolados bacterianos quanto à competitividade na rizosfera: o isolado PF22 apresentou 78,5% de colonização de raízes, seguido dos isolados PF16 com 46,6% e PF14 com 33,8% (Figura 9).

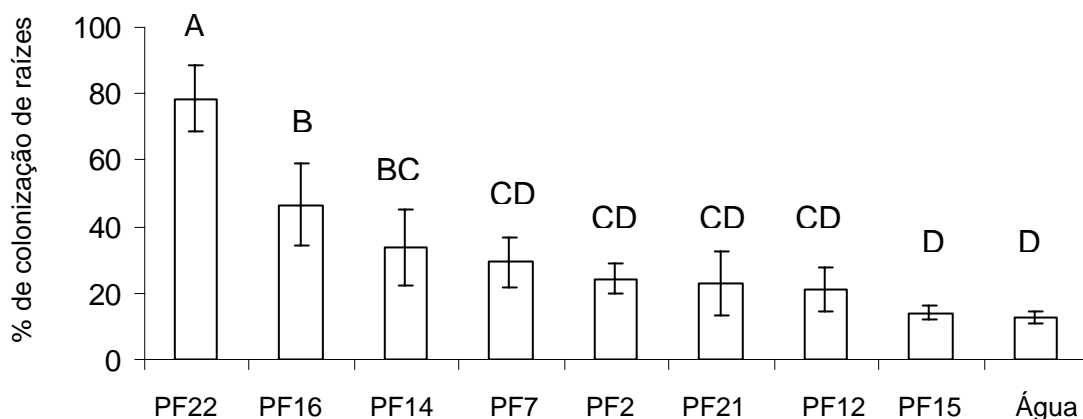


Figura 9 - Percentual de colonização das raízes de plantas de feijão (estádio fenológico V1) oriundas de sementes tratadas com oito isolados de *Pseudomonas spp.* fluorescentes (PF) e cultivadas em tubetes contendo solo natural, acondicionados em caixa de raiz e mantidos em câmara de crescimento. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.4.5. Ensaio 5 - Competitividade rizosférica de bactérias contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*

A colonização das raízes pelos isolados apresentou-se distribuída aleatoriamente em toda a raiz (Figura 2). Na colonização interna das raízes, os isolados PF22, PF16 e PF14 foram competitivos pelos sítios de infecção, verificado por uma redução no número de UFC de FOPm/g de raiz. O

isolado PF22 reduziu de 5,4 para 3,6 a média de UFC de FOPm e foi similar ao PF16 que reduziu para 3,8 UFC de FOPm/g de raiz (Figura 10).

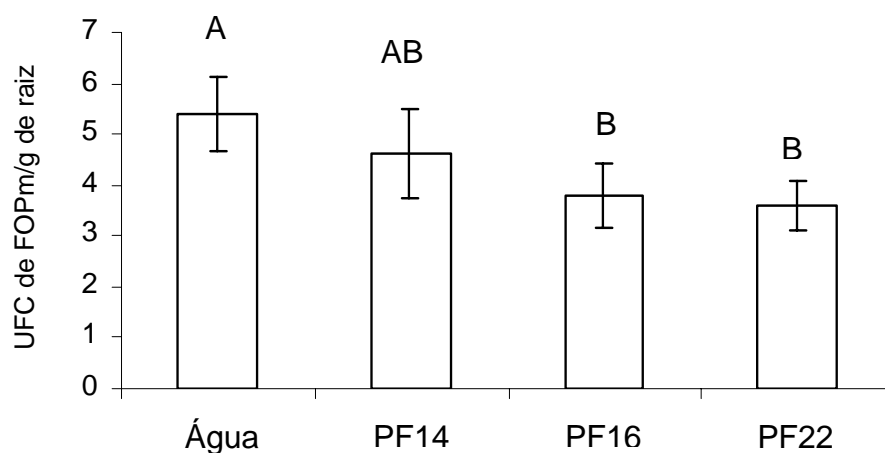


Figura 10 - Unidades formadoras de colônias, na diluição 10^{-2} , de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (UFC de FOPm) obtidas internamente de raízes de plantas de feijão (estádio fenológico V2) oriundas de sementes tratadas e não tratadas com isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (PF14, PF16 e PF22) e cultivadas em casa de vegetação em tubetes contendo solo natural infestado com FOPm. Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.5. Efeito individual e conjunto de microrganismos na supressão da murcha-vascular em casa de vegetação e campo

3.5.1. Efeito individual

A taxa das clorofilas A, B e total decresceu ao longo do tempo para todos os isolados FO testados, entretanto, as plantas submetidas ao tratamento FO3 ainda continham folhas verdes até o final das avaliações (estádio R9), ao contrário dos demais tratamentos (Figura 11). Analisando-

se a AACDCL, a produção das plantas de feijão e a severidade da murcha-vascular, não houve diferença entre as concentrações de inóculo para um mesmo isolado, mas houve diferença entre os isolados. Com base na Área Abaixo da Curva de Decréscimo da Clorofila (AACDCL) o isolado FO3 foi o melhor tratamento para as clorofilas A e total, e diferiu dos demais tratamentos (Figura 12), isso significa que as plantas cultivadas em solo que continha o isolado FO3, em qualquer uma das concentrações testadas, permaneceram verdes por maior período de tempo devido ao atraso do aparecimento dos sintomas de amarelecimento causado pela murcha-vascular. A média da AACDCL para a clorofila total das plantas expostas ao isolado FO3 foi de 7,10, enquanto que para as plantas cultivadas em solo contendo apenas o FOPm a AACDCL foi de 3,25.

Avaliando-se a produção de vagens e a matéria seca dos grãos, observou-se que a maior produção foi obtida com o isolado FO3 (Tabela 3), com uma média de 13,56 vagens e 6,65 g de matéria seca dos grãos, enquanto que plantas expostas apenas a FOPm no solo produziram 10,00 vagens e 2,23 g de matéria seca de grãos.

Quanto à severidade da murcha-vascular as plantas cultivadas em solo infestado apenas com FOPm apresentaram severidade média de 4,25, enquanto que plantas cultivadas em solo infestado com FOPm e FO3 em conjunto apresentaram severidade média de 2,37 (Tabela 3).

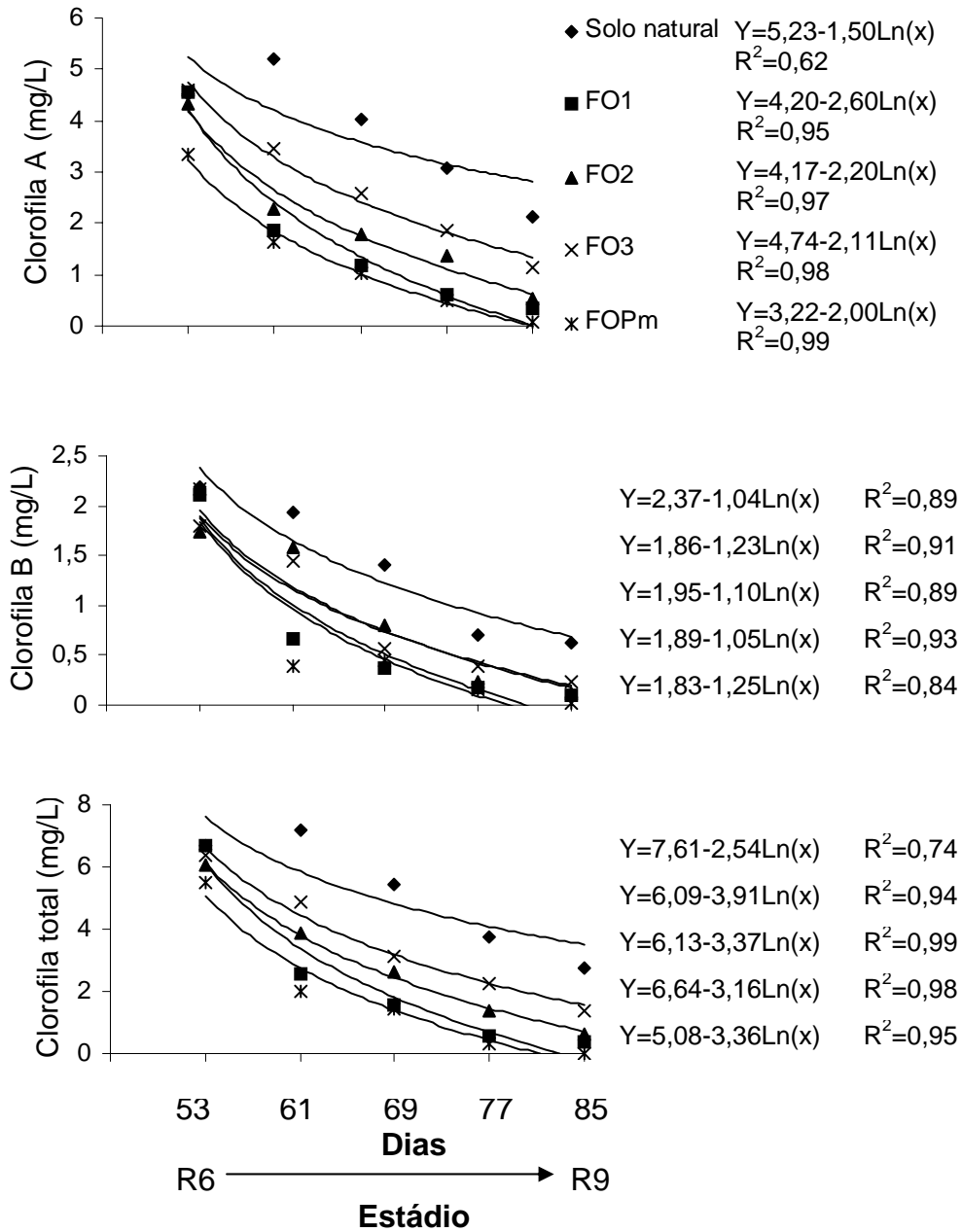


Figura 11 - Clorofila A, B e total (mg/L) de plantas de feijão (estádio fenológico R6 a R9) cultivados em casa de vegetação em vasos contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOPm) e com isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2 e FO3).

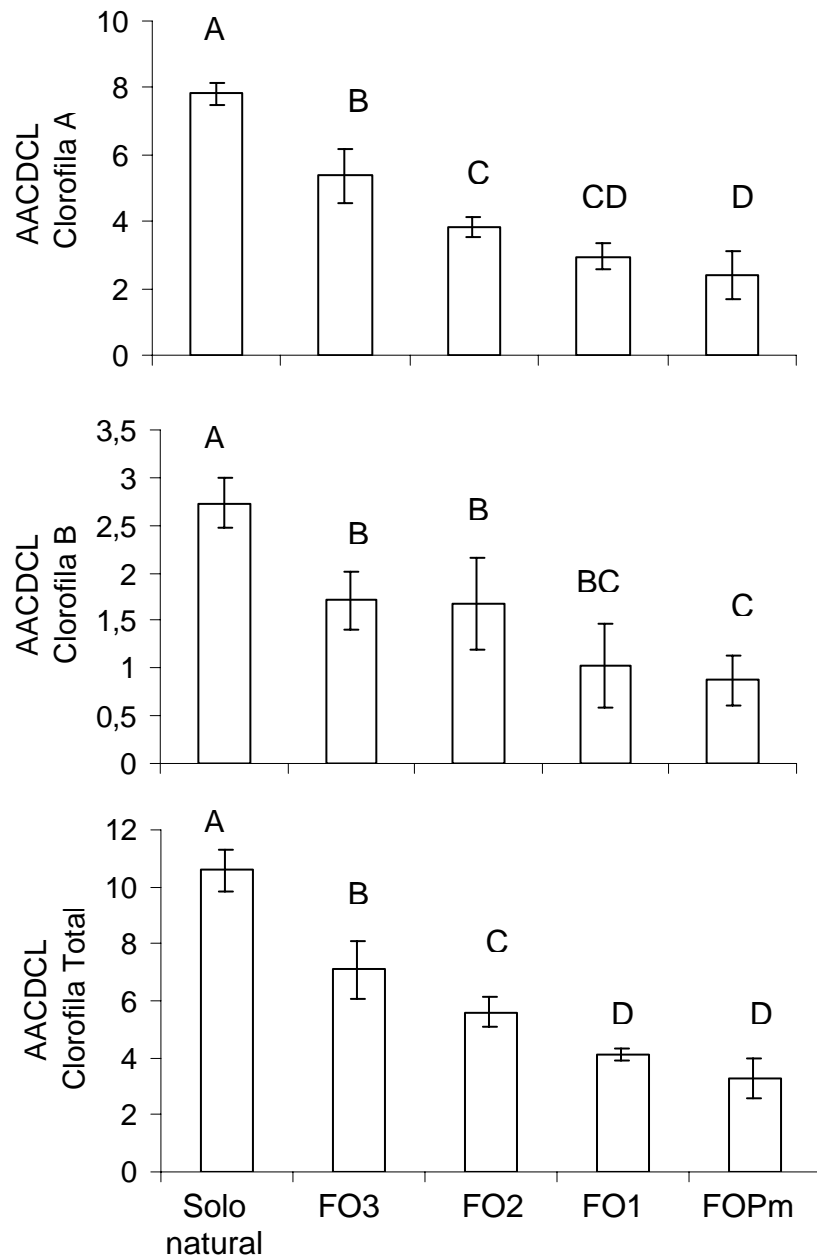


Figura 12 - Área abaixo da curva de decréscimo da clorofila (AACDCL), obtida das clorofilas A, B e total de folhas de feijoeiros (estádio fenológico R6 a R9) cultivados em casa de vegetação em vasos contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f.sp. *phaseoli* (FOPm) e com isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2 e FO3). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

Tabela 3 – Valores médios de severidade da murcha-vascular (SEV), obtidos no estágio fenológico R8, número de vagens (NV) e matéria seca dos grãos (MS) de plantas de feijão cultivadas em casa de vegetação em vasos contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOPm) e com isolados de *F. oxysporum* não-patogênicos (FO1, FO2 e FO3).

TRATAMENTO	SEV	NV	MS
Solo natural	1,00 A	16,50 A	13,56 A
FO3	2,37 B	13,56 B	6,65 B
FO2	3,18 C	11,62 BC	3,71 C
FO1	3,75 D	10,50 C	4,47 C D
FOPm	4,25 D	10,00 C	2,23 D
CV %		22,43	38,15
F	*	*	*

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Valores nas colunas, correspondem à média de cinco repetições, seguidos pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em outro ensaio avaliando-se a severidade da murcha-vascular em plantas de feijão oriundas de sementes tratadas com os isolados bacterianos PF22, PF16 e PF14 e cultivadas em vasos contendo solo infestado com FOPm obteve-se que as médias não diferiram entre si, exceto do controle positivo (solo natural) onde a severidade foi zero (Figura 13).

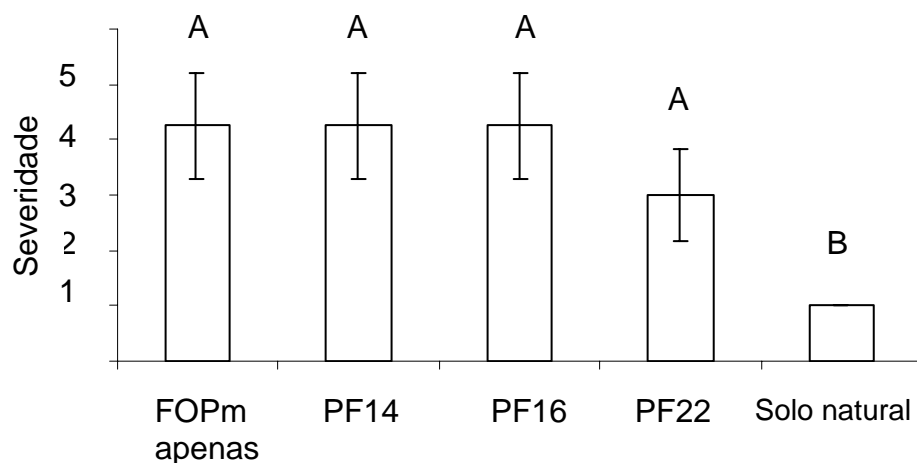


Figura 13 – Severidade da murcha-vascular de plantas de feijão (estádio fenológico R8) oriundas de sementes tratadas com isolados de *Pseudomonas spp.* fluorescentes (PF14, PF16 e PF22) e cultivadas em casa de vegetação em vasos contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOPm). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.5.2. Efeito conjunto em casa de vegetação

No estudo da associação dos isolados fúngico e bacteriano, observou-se que os microrganismos PF22 e FO3 utilizados em conjunto tiveram efeito no atraso do aparecimento dos sintomas da murcha-vascular do feijoeiro em casa de vegetação. A taxa das clorofilas A, B e total decresceu ao longo do tempo, as plantas submetidas ao tratamento FO3 mais PF22 ainda continuam folhas verdes até o final das avaliações (estádio R9). Por outro lado, as plantas do tratamento FOPm amareleceram (0mg/L de clorofila) a partir da terceira avaliação (estádio R8) em decorrência da ação do patógeno (Figura 14). As plantas cultivadas com PF22 em conjunto com FO3 apresentaram AACDCL para as clorofilas A, B e total de 4,52; 1,05

e 5,57 respectivamente, enquanto que em plantas cultivadas em solo contendo somente FOPm a AACDCL foi de 0,92; 0,23 e 1,16 para as clorofilas A, B e total, respectivamente (Figura 15).

A redução da murcha-vascular do feijoeiro, nesse ensaio, também pôde ser verificada pela produção de vagens e grãos. As plantas submetidas ao tratamento PF22 + FO3 produziram um número médio de 15,16 vagens e matéria seca dos grãos de 12,59 g, enquanto plantas cultivadas em solo somente com FOPm tiveram uma produção de apenas 9,8 vagens e 5,71 g de grãos (Tabela 4). A severidade da murcha-vascular foi reduzida de 4,3 para 2,5 pela ação conjunta dos isolados PF22 e FO3 (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores médios de severidade da murcha-vascular (SEV), obtidos no estágio fenológico R8, número de vagens (NV) e matéria seca dos grãos (MS) de plantas de feijão oriundas de sementes tratadas com *Pseudomonas* fluorescentes (PF22) e cultivado em casa de vegetação em vasos contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOPm) e com *F. oxysporum* não-patogênico (FO3).

TRATAMENTO	SEV	NV	MS
Solo natural	1,00 A	16,33 A	13,16 A
PF22 + FO3	2,50 B	15,16 A	12,59 A
FOPm	4,30 C	9,80 B	5,71 B
CV %	29,39	10,29	16,10
F	*	*	*

* Significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F.

Valores nas colunas, seguidos pela mesma letra, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

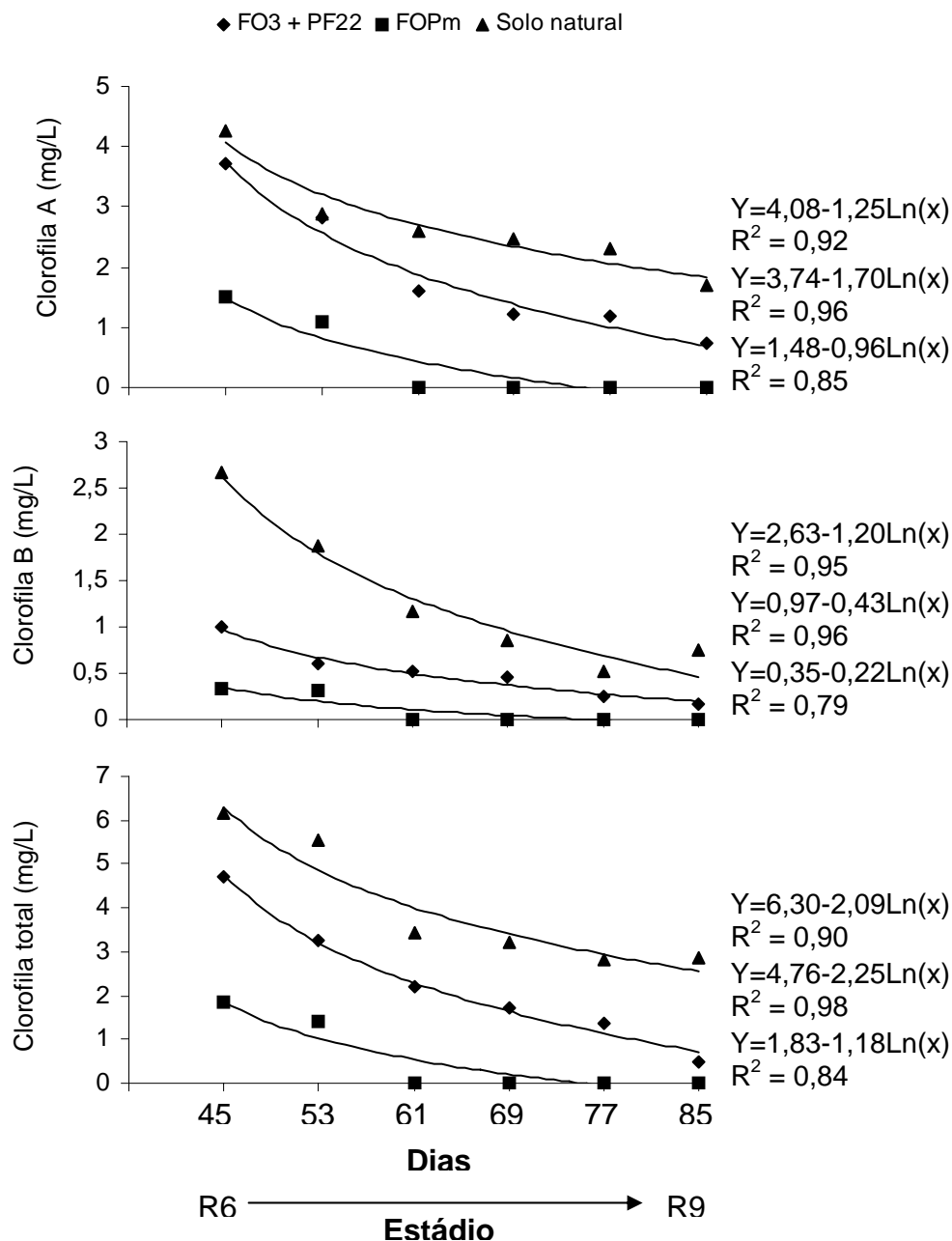


Figura 14 - Clorofila A, B e total (mg/L) de plantas de feijão (estádio fenológico R6 a R9) oriundas de sementes tratadas com *Pseudomonas* fluorescentes (PF22) e cultivadas em casa de vegetação em vasos contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOPm) e com *F. oxysporum* não-patogênico (FO3).

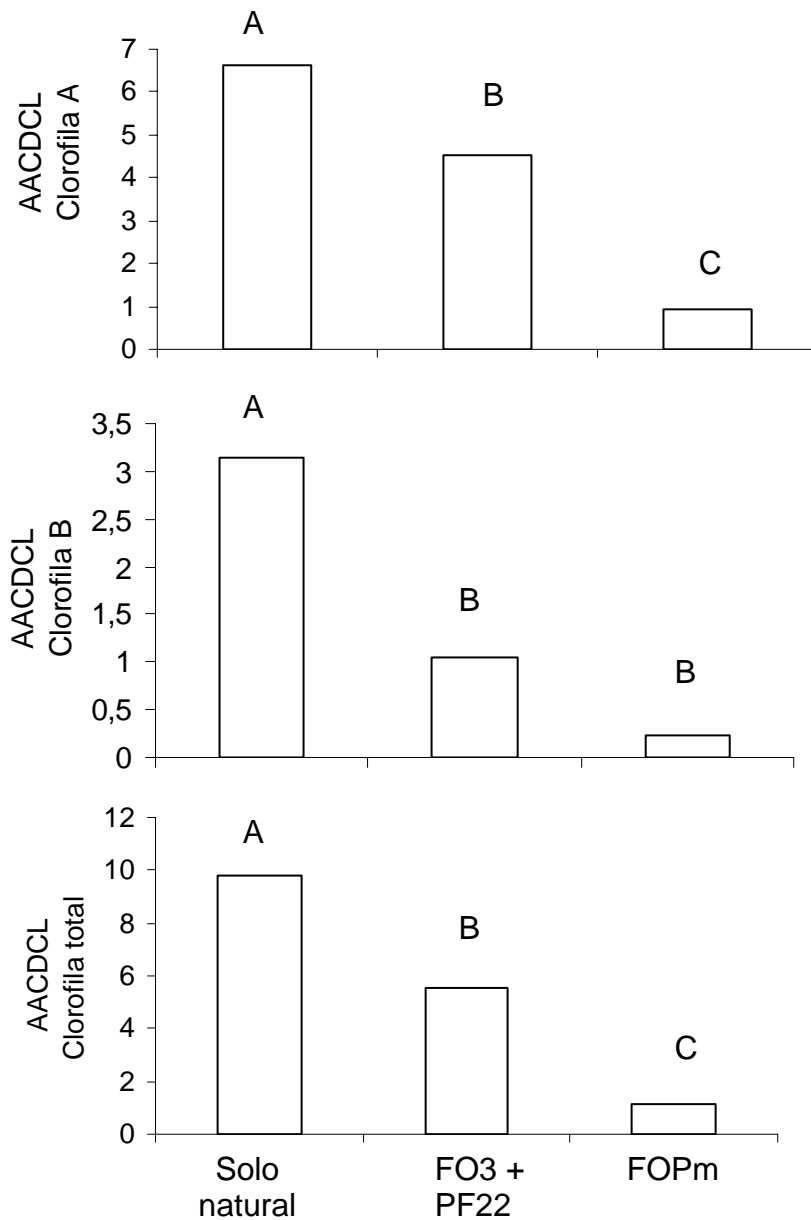


Figura 15 - Área abaixo da curva de decréscimo da clorofila (AACDCL), obtida das clorofilas A, B e total de plantas de feijão (estádio fenológico R6 a R9) oriundas de sementes tratadas com *Pseudomonas* fluorescentes (PF22) e cultivadas em casa de vegetação em vasos contendo solo natural infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOPm) e com *F. oxysporum* não-patogênico (FO3). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de cinco repetições e as barras representam o desvio padrão.

3.5.3. Efeito conjunto no campo

No campo, não houve diferença na germinação de sementes entre os tratamentos, a média foi de 90% de germinação.

A taxa das clorofilas A, B e total decresceu ao longo do tempo (Figura 16). Analisando-se a AACDCL para a clorofila total, obteve-se que os tratamentos não diferiram entre si, porém diferiram significativamente do FOPm sozinho (Figura 17).

Verificou-se que a incidência da murcha-vascular (Figura 18) foi reduzida no campo quando se usou a associação do tratamento de sementes com o isolado bacteriano PF22 e infestação do solo com o isolado de *Trichoderma* (TR11) ou com o isolado não-patogênico de *F. oxysporum* (FO3). A incidência foi reduzida de uma média de 92% (tratamento apenas com FOPm) para 76% (TR11+PF22) ou 62% (FO3+PF22).

Quanto à produção de vagens e matéria seca dos grãos de feijão, observou-se que a associação dos microrganismos FO3 + PF22 e TR11 + PF22 não diferiram entre si, com uma produção de 15 e 14 vagens e 14,7 e 13,1 g, respectivamente. A produção do tratamento apenas com FOPm foi de 8,3 vagens e 4,5 g (Figura 18). Esses valores mostram um aumento de aproximadamente 200% na produção de grãos quando utilizados os microrganismos em conjunto no controle da doença.

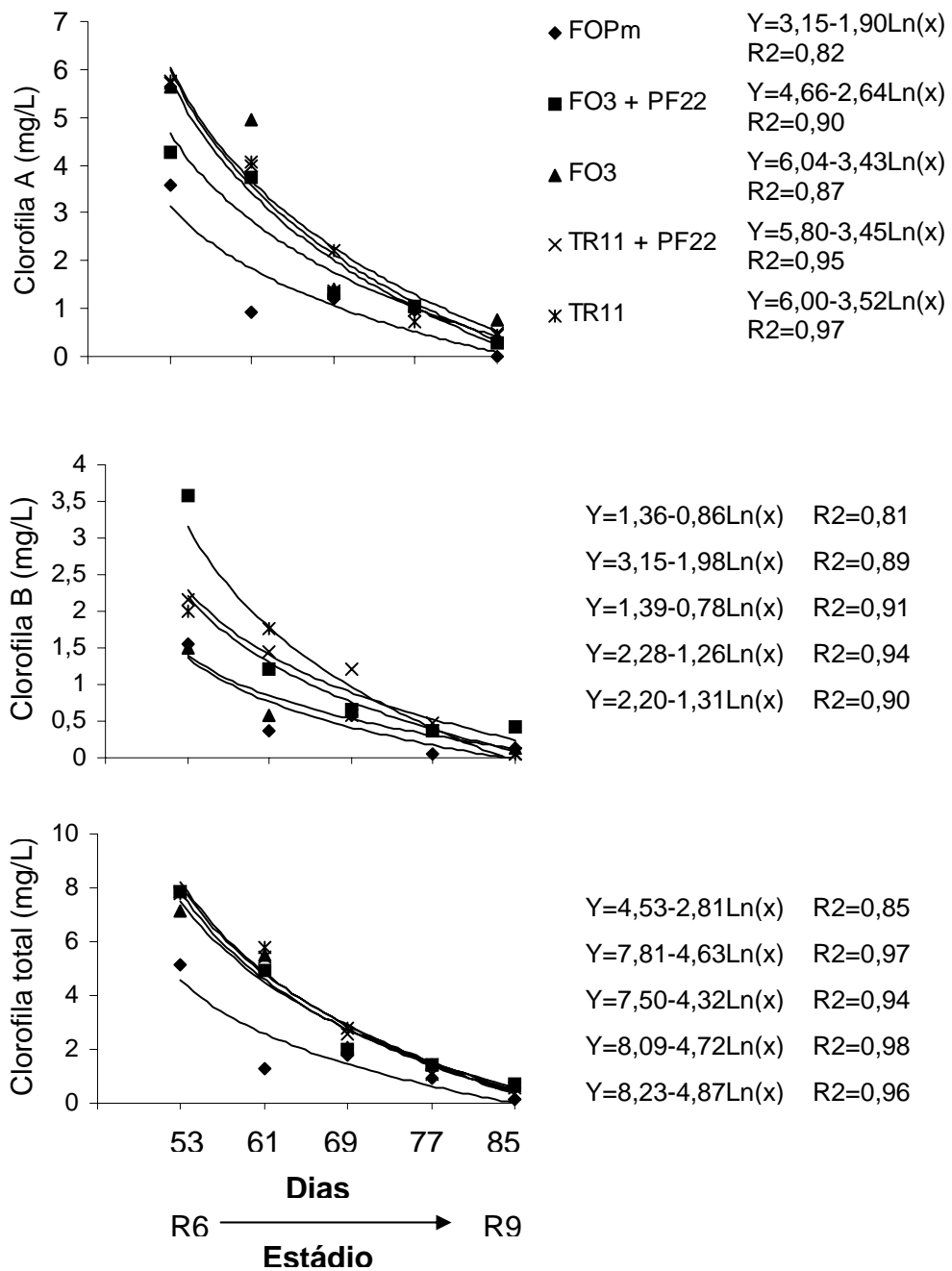


Figura 16 - Clorofila A, B e total (mg/L) de plantas de feijão (estádio fenológico R6 a R9) oriundas de sementes tratadas com *Pseudomonas fluorescentes* (PF22) e cultivadas no campo em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOPm), *F. oxysporum* não-patogênico (FO3) e *Trichoderma* (TR11).

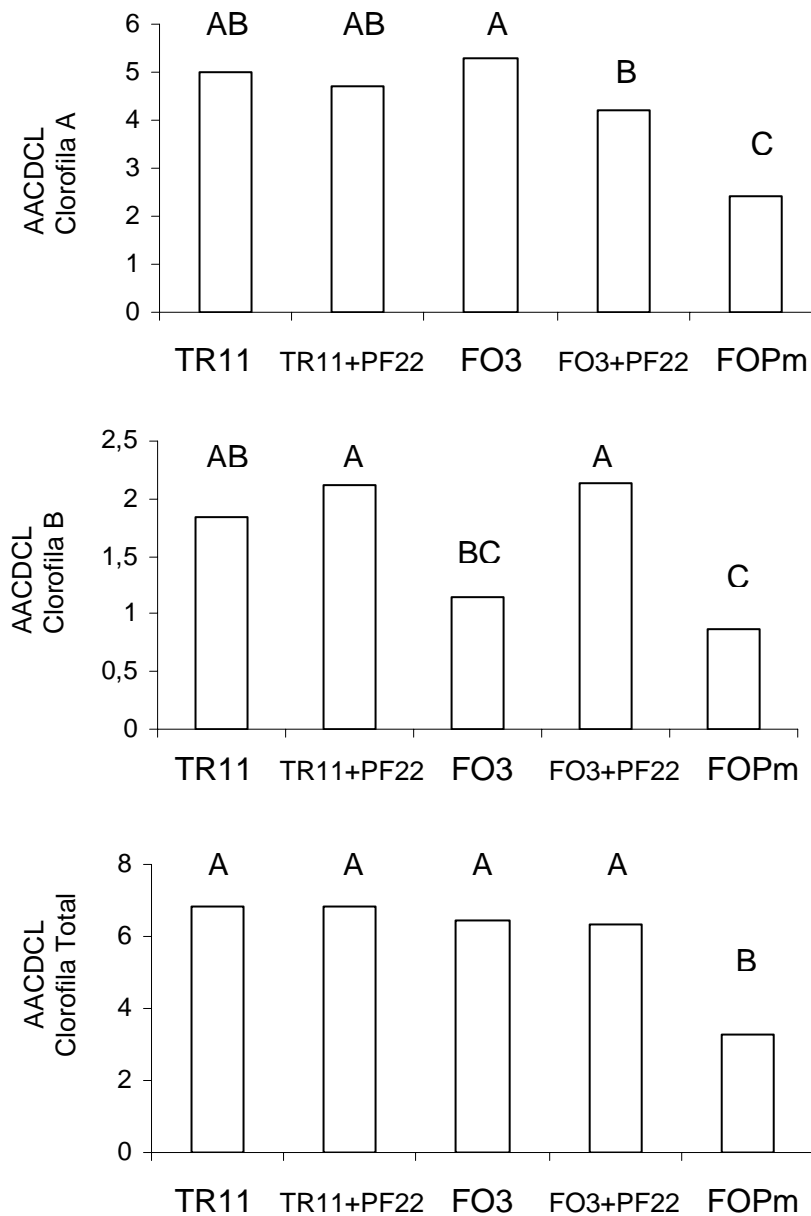


Figura 17 - Área abaixo da curva de decréscimo da clorofila (AACDCL), obtida das clorofilas A, B e total de plantas de feijão oriundas de sementes tratadas com *Pseudomonas* fluorescentes (PF22) e cultivadas no campo em solo infestado com *F. oxysporum*. f. sp. *phaseoli* (FOPm), *F. oxysporum* não-patogênico (FO3) e *Trichoderma* (TR11). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

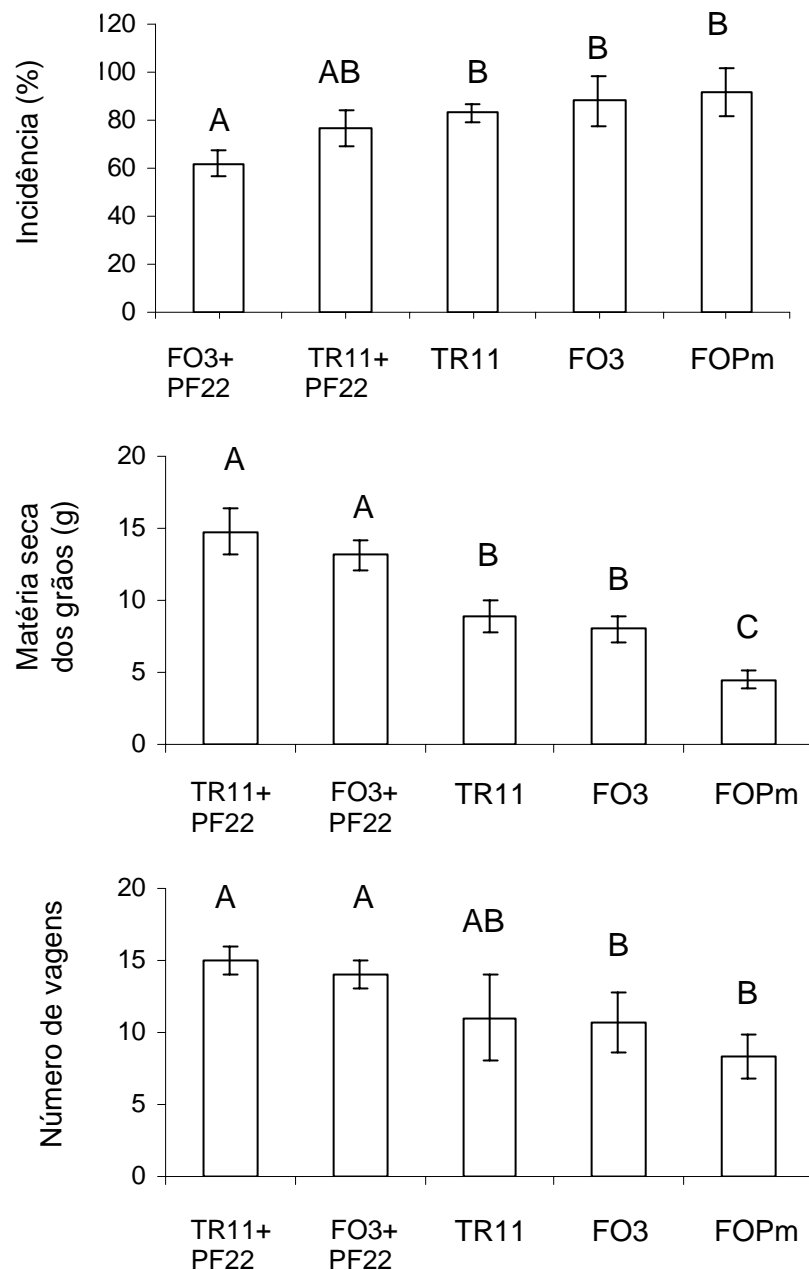


Figura 18 – Incidência da murcha-vascular, número de vagens e peso da matéria seca dos grãos de feijão oriundos de sementes tratadas com *Pseudomonas* fluorescentes (PF22) e cultivadas no campo em solo infestado com *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli* (FOPm), *F. oxysporum* não-patogênico (FO3) e *Trichoderma* (TR11). Tratamentos seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Os valores correspondem às médias de três repetições e as barras representam o desvio padrão.

4. DISCUSSÃO

Isolados não-patogênicos de *F. oxysporum* são habitantes do solo e de raízes de várias culturas, seja em solos condutivos ou supressivos à murcha-vascular. Esses microrganismos têm sido encontrados em maior ou menor proporção como componentes da microflora do solo. Ocorrência semelhante é atribuída aos isolados de *Trichoderma spp.* O presente estudo confirmou o potencial antagonístico de isolados de *F. oxysporum* não patogênicos e de *Trichoderma spp.*, tendo sido ambos os fungos competitivos com o patógeno alvo, observado pelos testes “in vitro”. O fato de *T. harzianum* crescer sobre a colônia do patógeno, pode indicar que seu antagonismo seja por parasitismo.

A análise molecular de populações de *F. oxysporum* não-patogênicas, oriundas do solo das culturas do tomate e trigo, comparando a região IGS (intergenic spacer) desses microrganismos revelou que a estrutura das populações associadas às raízes de trigo e tomate diferiu entre si da estrutura das populações isoladas do solo (EDEL *et al.*, 1997). Os autores sugeriram que houve especificidade entre os isolados e a planta hospedeira, possivelmente por componentes bioquímicos presentes nos exsudatos radiculares das culturas. Informação que reforça a elegermos os isolados de FO a potenciais antagonistas, considerando que foram obtidos da rizosfera de plantas de feijão.

Quando os isolados não patogênicos foram submetidos ao teste de competência e competitividade em solo natural, observou-se que o isolado FO3 se destacou dos demais na capacidade de colonizar a rizosfera e também na competitividade por sítios de colonização das raízes. Mesmo exposto à microflora presente no solo, esse isolado foi capaz de manter sua população dominante no ecossistema microbiano e também foi capaz de obter vantagem na colonização e na ocupação de sítios de colonização das plantas, dando a entender que este fungo tem alta capacidade saprofítica e de colonização endofítica. OLIVAIN e ALABOUVETTE (1997) mostraram que isolados de *F. oxysporum* não patogênicos obtidos da rizosfera de plantas de tomate foram capazes de colonizar a superfície e todos os tecidos de raízes dessa hortaliça, exceto os tecidos vasculares, resultando no controle da murcha-vascular em plantas de tomateiro cultivadas em solo condutivo.

Quanto à localização das colônias preferencialmente nas pontas da raiz, região de crescimento radicular e conseqüentemente de maior exsudação, devido ao rompimento de células, reforça a hipótese dessa espécie de fungo penetrar mais por ferimentos no sistema radicular da planta hospedeira. Por outro lado há evidências de plantas, com sistema radicular lesionado e não-lesionado, inoculadas com isolados de FO não terem mostrado diferença quanto à habilidade desses microrganismos de colonizar o córtex radicular (SCHNEIDER, 1984).

Nos ensaios de competitividade com o FOPm, observou-se mais uma vez que o isolado FO3 destacou-se dos demais quanto à competitividade na rizosfera e por sítio de colonização havendo redução de UFC de FOPm. Esses resultados são justificados pela elevada capacidade saprofítica característica dos isolados não patogênicos, reforçada pela maior densidade de inóculo desse antagonista usado na infestação do solo.

No teste de concentrações dos isolados de FO não-patogênicos para redução da infecção de FOPm, diferentes concentrações de inóculo reduziram similarmente a infecção por FOPm. Possivelmente este fato esteja relacionado a um número restrito de sítios de infecção por unidade de comprimento da raiz ou que os sítios de infecção sejam suscetíveis à

infecção por um período limitado de tempo (SCHNEIDER, 1984), que teria sido saturado em concentrações pelo menos quatro vezes superior à concentração de FOPm. Outra possibilidade é que as pontas das raízes, conhecidas como sendo locais onde ocorre a maior quantidade de sítios de infecção disponíveis de *F. oxysporum* patogênico em várias culturas suscetíveis, ocupadas por um competidor não-patogênico tenha levado a taxas de infecção reduzidas de raízes pelo patógeno em função da proporção de inóculo do antagonista em relação ao patógeno. Há ainda a possibilidade de estímulo ao aumento da infecção pelo patógeno. Acredita-se que esse fenômeno seja precedido pela existência de um equilíbrio efetivo entre os competidores na rizosfera, indução à suscetibilidade ou predisposição da planta hospedeira ao patógeno (SCHNEIDER, 1984). O efeito similar das concentrações também refletiu na taxa de clorofila que decresceu ao longo do tempo o que já era esperado, por tratar-se de um patógeno que coloniza os tecidos vasculares do hospedeiro dificultando o fluxo de nutrientes ao longo da planta. A competição ocasionada pela presença dos isolados não patogênicos, não impediu que a infecção ocorresse e que a taxa de clorofila decrescesse. Entretanto, a presença do antagonista deve ter retardado a colonização dos tecidos vasculares pelo patógeno e, conseqüentemente, retardou o decréscimo da clorofila, mantendo as plantas verdes por um maior período de tempo. O retardamento no decréscimo da taxa de clorofila permitiu que as plantas continuassem com seu metabolismo ativo, respiração, fotossíntese e produção de fotossimilados, o que permitiu a obtenção de uma produção superior ao controle negativo no qual o solo só estava infestado com o agente causal da doença. Comportamento semelhante foi observado também na severidade e produção. Embora tenha sido observado que as diferentes concentrações do antagonista (FO1, FO2, FO3) não tenha tido efeito diferencial para um mesmo isolado nos componentes observados: competição por sítio de infecção, severidade da doença, taxa de clorofila e produção, constatou-se significativo efeito entre os isolados dos antagonistas não somente entre si como também quando comparados com

o controle mantendo a hipótese do potencial antagonismos desses isolados ao FOPm.

A seleção de *Pseudomonas* fluorescentes para uso contra doenças causadas por patógenos de solo não é baseada somente na facilidade de isolamento e manuseio; suas características ecológicas e fisiológicas as tornam fortes candidatas a agentes de controle biológico. O habitat natural desse grupo de bactérias é o solo, mais especificamente a matéria orgânica e a rizosfera. Conseqüentemente, quando elas são usadas para infestar o solo como agentes de biocontrole têm facilidade em se instalar, crescer e sobreviver. São organismos extremamente versáteis, capazes de utilizar um largo número de substratos orgânicos bem como metabólitos de outras bactérias gram-negativas, também são estimulantes do crescimento de raízes. São bactérias que têm rápida taxa relativa de crescimento quando comparadas com outras bactérias habitantes da rizosfera; *Pseudomonas* fluorescentes produzem uma variedade de antibióticos e sideróforos que podem inibir o crescimento de bactérias e fungos fitopatogênicos "in vitro". Pesquisas em solos naturalmente supressivos têm revelado que, em alguns casos, bactérias desse grupo têm promovido o controle biológico de doenças (PARKER et al., 1983).

Pseudomonas fluorescentes são encontradas no solo, associadas à rizosfera e ao rizoplano e internamente nas raízes de plantas. Algumas são denominadas de Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP) pela capacidade de promover o crescimento de espécies vegetais (BOTELHO et al., 1998). A proporção dessas bactérias no solo ainda não está bem esclarecida. A maior percentagem desses microrganismos tem sido isolada da rizosfera, local de maior atividade da microflora e da macroflora do solo. Na superfície da raiz e internamente à mesma as populações são menores, em decorrência das barreiras bióticas que essas populações teriam que enfrentar para alcançar os sítios de colonização (PARKER et al., 1983). O que não contradiz os resultados encontrados no presente trabalho, em que maior número de isolados foi obtido da rizosfera, seguido do rizoplano e endofíticas.

Dentre os fatores que influenciam a colonização de raízes por microrganismos estão os exsudatos radiculares, embora haja muitas dificuldades metodológicas nesse estudo. Os isolados bacterianos utilizados no presente estudo foram obtidos de plantas de feijão que já havia sido feito a colheita, as plantas estavam sob estresse hídrico e sob altas temperaturas dos meses de dezembro e janeiro, esse fato supostamente mostra que esses isolados seriam bons competidores na rizosfera do feijoeiro. Resultados de estudos envolvendo as culturas da beterraba e batata tem demonstrado que a maioria dos isolados bacterianos que colonizaram a raiz imediatamente após a emergência da planta continua colonizando o sistema radicular durante todo o ciclo da cultura, portanto pode-se assumir que bactérias que estão presentes até o final do ciclo da cultura podem ser mais competitivas na rizosfera (NAUTIYAL, 1997a).

O fato também das bactérias terem sido isoladas da rizosfera de feijoeiro pode favorecer sua atuação como antagonistas nessa cultura, baseado-se na teoria que pode existir especificidade pelos exsudatos radiculares da planta hospedeira. KLOPPER *et al.* (1980) observaram que quatro isolados bacterianos obtidos da rizosfera de rabanete foram eficientes em aumentar o crescimento dessa hortaliça; no entanto, quando os isolados foram usados com o mesmo propósito na cultura da batata, somente um isolado conseguiu manter-se. A falta de adaptação dos demais isolados pode ter sido devido à especificidade pelos exsudatos radiculares da planta hospedeira da qual foram obtidos.

Mais recentemente têm surgido evidências de que os exsudatos radiculares apresentam realmente seletividade e influenciam o crescimento bacteriano e fúngico, na região de crescimento da raiz. Em trabalho conduzido com aveia em diferentes locais da raiz observou-se a ocorrência de distintas comunidades microbianas associadas a diferentes partes do sistema radicular (YANG & CROWLEY, 2000). Sabe-se que constituintes dos exsudatos radiculares podem ser alterados dependendo da idade da raiz.

A obtenção no presente trabalho de um maior número de isolados bacterianos com antibiose a FOPm “*in vitro*” oriundos da rizosfera, reforça a

idéia de que essa área de influência da raiz é a de maior atuação de comunidades microbianas, em decorrência da maior disponibilidade de açúcares, aminoácidos, peptídios, vitaminas, enzimas e ácidos orgânicos oriundos da exsudação radicular.

Os 22 isolados de *Pseudomonas* fluorescentes não promoveram uma melhora na germinação das plantas, quando comparados com o tratamento controle. O favorecimento do crescimento de plantas é uma característica presente na maioria dos isolados de *Pseudomonas* fluorescentes, mas não foi observado no presente trabalho, embora, já tenha sido observado em outras culturas, ainda não está esclarecido com exatidão que mecanismo atua neste fenômeno. A resposta da planta está associada com a colonização da rizosfera por bactérias que se deslocaram da espermosfera para a rizosfera. Se a bactéria elabora produtos que influenciam diretamente o crescimento da planta ou afeta a composição da microflora das raízes por antagonismo favorecendo o crescimento da planta, ainda é questão merecedora de mais esclarecimentos. A melhoria dos métodos e formulações empregados para o tratamento de sementes poderia aumentar a performance de microrganismos veiculados pelas sementes. O efeito do tipo de solo e parâmetros fisiológicos como pH, tipo de argila e temperatura sobre a atividade do antagonista podem ser determinados. Estas informações são fundamentais para o entendimento dos mecanismos de colonização e de supressão de doenças vasculares e como estas respondem a diferentes estímulos de agentes de controle biológico. O controle biológico pode ser também melhorado por mudanças nas condições climáticas e particularidades dos constituintes do solo (NAUTIYAL, 1997b).

O isolado PF22 foi o que apresentou maior competência em colonizar as raízes, seguido dos isolados PF15, PF14, PF16, PF7, PF2, PF12, PF3, PF21, PF4, PF20, PF13, PF6, PF10, PF8 e PF17 que também foram competentes em colonizar a rizosfera de raízes de plantas de feijão. Esse resultado deve estar relacionado à afinidade pelos sítios de colonização da planta (embora tenha sido verificado que não houve preferência por sítios nas diferentes partes da raiz), e pela capacidade de

crescimento na presença de exsudatos radiculares e na ausência de competidores, já que o substrato era estéril.

Embora o isolado PF22 tenha se mostrado o melhor isolado tanto na competitividade na rizosfera quanto pela redução do número de UFC do patógeno, o mesmo comportamento não foi observado quando o isolado foi testado no controle da murcha-vascular em casa de vegetação. Esses resultados não inviabilizam necessariamente o uso desse isolado como antagonista. A causa real desse resultado não foi esclarecida, no entanto, pode-se conjecturar sobre o ocorrido. Sabe-se que a afinidade de *Pseudomonas* por íon ferro é muito alta, devido à necessidade desses microrganismos produzirem sideróforos para translocação desse micronutriente para o interior da célula. A deficiência desse produto no solo, bem como, alterações na microflora, pelo tempo de mistura no misturador mecânico, redução da exsudação radicular, como também pH, umidade, temperatura e tipo de argila podem ter afetado a capacidade competitiva desse grupo de bactérias neste estudo.

Nos ensaios em que foram usados os antagonistas juntos. Houve uma redução na severidade, na perda de clorofila e aumento na produção no tratamento com ação conjunta dos antagonistas, o retardamento no decréscimo da clorofila foi mais acentuado, observado pelos valores da AABCDCL, ou seja, as plantas permaneceram verdes por maior período de tempo, em relação ao controle refletindo na produção e mostrando o efeito sinérgico dos antagonistas no controle da murcha-vascular. As explicações para esse fenômeno ainda têm de ser formuladas. No entanto, acredita-se que a alta capacidade de competição por ferro de *Pseudomonas* fluorescentes em relação ao patógeno o tornou mais sensível à competição por carbono com o isolado de *F. oxysporum* não patogênico, resultando numa maior supressão da murcha quando comparado com a inoculação individual dos antagonistas.

LEEMAN *et al.* (1996) especulam que a supressão encontrada para a murcha em rabanete pela ação conjunta de *Pseudomonas*, e dos fungos *Acremonium*, *Verticillium* e *F. oxysporum* não patogênico pode ter ocorrido por vários mecanismos, como produção de pseudobactina pelo isolado

bacteriano, competição por ferro, resistência sistêmica induzida, entre outros.

As razões pelas quais dois agentes de biocontrole relativamente ineficientes, quando usados isoladamente, têm a sua atividade de biocontrole aumentada quando combinados não são completamente entendidas. Sabe-se que *Pseudomonas* fluorescentes reduziu a germinação de clamidósporos das formas patogênica e não patogênica de *F. oxysporum* na rizosfera de melão (PARK *et al.*, 1988). Segundo os autores, essa redução pode estar diretamente ligada ao nível de nutrientes dos exsudatos radiculares de várias plantas e também ao aumento da produção de sideróforos pela bactéria ligado a altos níveis de carbono. Dessa maneira, pode-se inferir no presente trabalho que a adição do inóculo de isolado não-patogênico aumentou e exsudação radicular nas plantas, aumentando a atividade de *Pseudomonas* fluorescentes na rizosfera, com isso, conferiu um maior tempo de vida útil produtiva às plantas pelo efeito sinérgico dos microrganismos.

A ação conjunta de *Pseudomonas* fluorescentes com isolado de *Trichoderma* mostrou um efeito semelhante à combinação FO3 + PF22 na redução da doença. Os mecanismos de atuação de *Trichoderma* podem ter sido antibiose, competição e parasitismo, embora não se saiba claramente que relação existe desse fungo com *Pseudomonas* fluorescentes, merecendo mais estudo sobre o assunto.

A ação conjunta dos antagonistas no campo superou os demais tratamentos quanto à produção de vagens e grãos e com relação à incidência final da doença. Esse resultado mais uma vez justifica mais estudos sobre a ação conjunta desses microrganismos na redução da murcha-vascular.

Os dados de controle da murcha-vascular em cravo sugerem que o biocontrole feito por *F. oxysporum* não patogênico e *Pseudomonas* fluorescentes são devidos à produção de pseudobactina, um sideróforo produzido por esse grupo de bactérias (LEMANCEAU, *et al.*, 1992). A competição por ferro e por carbono ocorre de maneira que a intensidade de competição intra-específica por carbono entre *F. oxysporum* não-patogênico

e patogênico depende da disponibilidade de ferro controlada pela atividade de sideróforos produzidos por *Pseudomonas* fluorescentes (PARK *et al.*, 1988). Esta hipótese parece explicar bem o efeito sinérgico da co-inoculação de *F. oxysporum* não patogênico com a bactéria no controle da murcha-vascular. Além da atividade de sideróforos, há evidências do antagonismo de *Pseudomonas* a *Fusarium* pela produção de fenazinas e antralinhas, antibióticos produzidos por essa bactéria (KLOEPPER *et al.*, 1980).

A competição entre formas não patogênicas e patogênicas de *Fusarium* e populações de *Pseudomonas* fluorescentes existe em vários solos. Entretanto, dependendo do nível da atividade dessas populações de antagonistas e da intensidade de competição, um mesmo tipo de interação pode resultar em conducividade ou supressividade do solo à murcha-vascular causada por *Fusarium* (ALABOUVETTE, 1999).

Do ponto de vista epidemiológico da murcha-vascular causada por *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*, as estratégias de biocontrole utilizadas neste estudo basearam-se em três princípios de controle de Whetzel: erradicação, proteção e regulação ou manipulação do ambiente. O controle biológico raramente erradica o patógeno. No entanto, o uso de barreiras biológicas realizadas neste estudo atuou diretamente no atraso do surgimento dos sintomas da murcha pela redução da densidade de inóculo e, conseqüentemente, da redução da taxa de progresso dessa doença monocíclica. Isso pode ser exemplificado pela redução da taxa de clorofila ao longo do tempo nos diferentes tratamentos, retardando os sintomas da doença e conseqüentemente uma vida útil maior da planta no seu ciclo resultando em maior produção.

O tratamento de sementes com PF22 associado a outros antagonistas revelou uma ação de proteção da semente atuando diretamente na tolerância ou indução de resistência no hospedeiro e na taxa média de infecção. A presença do isolado bacteriano sozinho não foi eficiente na redução da murcha-vascular. No entanto, esse quadro foi mudado quando o tratamento da semente foi somado com o isolado FO3.

A introdução dos antagonistas no solo constitui o princípio da regulação que atua no ambiente e na taxa de crescimento da doença. A manipulação do ambiente do solo procura prevenir o aumento e a formação de inóculo do patógeno, desalojar os patógenos dos resíduos das culturas, destruir os propágulos dos patógenos e estimular a população de microrganismos benéficos. As interações microbianas em alguns solos podem naturalmente prevenir o estabelecimento do patógeno ou inibir suas atividades patogênicas ocasionando um fenômeno denominado “solo supressivo” que se opõe a “solo condutivo”.

O controle biológico, ao contrário do químico, não apresenta efeito imediato e de destaque. O nível de controle obtido com um método biológico, isoladamente, pode estar abaixo do necessário para que danos à produção não ocorram. Sendo assim, é necessária a integração de agentes de biocontrole visando um efeito aditivo ou sinérgico. Isto foi observado no presente estudo pela introdução conjunta no solo de PF22 + FO3 e PF22 + TR11. Dessa forma, o controle biológico atuaria num contexto de restaurar o equilíbrio biológico no solo. A manipulação do ambiente do solo procura prevenir o aumento e a formação de inóculo do patógeno alvo. As chances de sucesso do controle biológico são aumentadas quanto maior e mais variada for a população microbiana utilizada para infestar o solo como antagonistas. A performance dos antagonistas está diretamente ligada e pode ser intensificada por meio de medidas como alteração no pH do solo, a um nível favorável aos antagonistas e desfavorável ao patógeno, utilização de métodos de cultivo que melhorem a estrutura do solo, escolha da época de semeadura que seja mais favorável ao hospedeiro e ao antagonista do que ao patógeno, adição de matéria orgânica e a seleção de métodos de cultivo que favoreçam o antagonista.

Dessa forma, o controle obtido no presente trabalho pode ser entendido como um tipo de supressividade, onde grupos específicos de microrganismos (PF22, FO3 e TR11) introduzidos no solo alteraram provavelmente a composição biótica deste solo, trazendo um efeito deletério à população do patógeno. Pode ser entendido também como o início de um restabelecimento de equilíbrio das comunidades microbianas, que pode ser

somado à utilização das medidas acima citadas que favoreçam os aspectos abióticos do solo tornando-os mais favoráveis aos antagonistas. Sugere-se que outros trabalhos com repetidas aplicações dos antagonistas no solo poderiam aumentar a vantagem dessas comunidades em relação às patogênicas, ocasionando uma redução da densidade de inóculo ao longo dos ciclos da cultura e, conseqüentemente, uma redução da ocorrência da doença a níveis toleráveis pelo produtor.

5. CONCLUSÕES

Os isolados fúngicos FO3 (*F. oxysporum* não patogênico) e TR11 (*T. harzianum*) e o isolado PF22 (*P. putida*) foram os mais competentes e competitivos na rizosfera e por sítios de colonização de plantas de feijão, observados a partir da quantificação das UFC interna e externamente à raiz, pelo percentual de colonização externa de raízes montadas e pela redução das UFC do fungo FOPm na rizosfera e internamente à raiz.

Os isolados de *Pseudomonas* fluorescentes não reduziram a severidade da murcha-vascular quando usados isoladamente.

Os isolados de FO não-patogênicos, em qualquer uma das concentrações testadas, não tiveram efeito na severidade da murcha-vascular, taxa de clorofila e produção entre concentrações de um mesmo isolado, no entanto quando comparados entre si e com a testemunha negativa (FOPm) induziram atraso no aparecimento dos sintomas da doença (observado pelo menor decréscimo na clorofila), reduziram a severidade da doença e obteve-se maior produção de vagens e grãos, sendo esse efeito mais pronunciado quando se utilizou o isolado FO3.

A ação conjunta dos antagonistas FO3 + PF22 teve um efeito sinérgico no controle da murcha-vascular, observado pela redução da severidade da doença, redução no decréscimo da clorofila ao longo do ciclo da cultura e pelo aumento na produção observado em casa de vegetação.

Todos os potenciais antagonistas usados no campo, sejam individualmente ou em conjunto, foram capazes de atrasar o surgimento dos sintomas da murcha-vascular, observado pelo retardo no decréscimo da clorofila. PF22 em conjunto com TR11 ou FO3 reduziu a perda na produção e a incidência da murcha-vascular nas plantas de feijão.

As estratégias utilizadas neste trabalho para o controle da murcha-vascular mostraram-se promissoras, revelando os isolados de *Trichoderma harzianum* (TR11), *Fusarium oxysporum* não-patogênico (FO3) e de *Pseudomonas* fluorescentes (PF22- *Pseudomonas putida*) como potenciais agentes de biocontrole dessa doença. Estes isolados reduziram a densidade de inóculo do patógeno, atrasaram o surgimento dos sintomas da doença e reduziram as perdas na produção de feijão.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAWI, C. S., PASTOR-CORRALES, M. A. **Root rots of bean in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies**. Cali, CIAT, 1990. 114p.
- ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* wilt pathogens in suppressive soils. In: HORNBY, D. (Ed.) **Biological Control of Soil-borne Plant Pathogens**. Wallingford, CAB, p.27-43, 1990.
- ALABOUVETTE, C. *Fusarium* wilt suppressive soils: an example of disease-suppressive soils. **Australasian Plant Pathology**, v.28, p.57-64, 1999.
- ALABOUVETTE, C., COUTEAUDIER, Y., LOUVET, J. Recherches sur la resistance des sols aux maladies. IX Dynamique des populations du *Fusarium* spp. dans um sol sensible aux fusarioses vasculaires. **Agronomie**, v.4, p.729-733, 1984.
- ALABOUVETTE, C., LEMANCEAU, P., STEINBERG, C. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts. **Pesticide Science**, v.37, p.365-373, 1993.
- ALOJ, B., MARZIANO, F., ZOINA, A., NOVIELLO, C. La tracheofusariosi del fagiolo in Italia. **Inf. Fitopatol.**, v.11, n.1, p.63-66, 1983.
- ALVES-SANTOS, F. M., BENITO, E. P., ESLAVA, A. P. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* strains from common bean fields in Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.8, p.3335-3340, 1999.

- ARMSTRONG, G. M., ARMSTRONG, J. K. *Fusarium* wilt of bean in south Carolina and some host relations of the bean *Fusarium*. **Plant Disease Reporter**, v.47, p.1088-1091, 1963.
- ARMSTRONG, G. M., ARMSTRONG, J. K. Pathogenicity of isolates of the beans wilt *Fusarium* from England and United States. **Plant Disease Reporter**, v.48, n.11, p.846-847, 1964.
- BILES, C. L., MARTYN, R. D. Local and systemic resistance induced in watermelons by formae speciales of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.79, p.856-860, 1989.
- BOTELHO, G. R., GUIMARÃES, V., DE BONIS, M. E. F., FONSECA, HAGLER A. N., HAGLER, L. C. M. Ecology of a plant growth-promoting strain of *Pseudomonas fluorescens* colonizing the maize endorhizosphere in tropical soil. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, p.499-504, 1998.
- CARDOSO, C. O. N., KIMATI, N. H., FERNANDES, N. G. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *phaseoli* Kendrick e Snyder, causando murcha em feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v.23, p.273-276, 1966.
- COELHO NETTO, R. A. Hospedeiros alternativos e potencial de isolados não patogênicos de *Fusarium oxysporum* na supressão de murcha de *Fusarium* do feijoeiro. **Tese D. S.**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1998. 72p.
- COELHO NETTO, R. A., DHINGRA, O. D. Colonização de raízes de espécies não hospedeiras por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.289, 1997.
- COELHO NETTO, R. A., DHINGRA, O. D. Grupos de compatibilidade vegetativa entre isolados de *Fusarium oxysporum* não-patogênico ao feijoeiro e de *F. oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.546-548, 1999.
- COELHO NETTO, R. A., DHINGRA, O. D. Hospedeiros de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.156-159, 1999.
- COSTA, H. Integração de medidas para o controle da murcha de *Fusarium* em feijão. **Tese D. S.**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. 1999. 62p.
- COSTA, H., VENTURA, J. A., LIBERATO, J. R. Incidência de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em sementes de feijão no Espírito Santo. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, p.316, 1993.

- CUGUDDA, L., GARIBALDI, A. Soil suppressive of carnation wilt: studies on mechanisms of suppressiveness. **Acta Horticultural**, v.213: p.67-76, 1987.
- DAVIS, D. Cross-protection in *Fusarium* wilt diseases. **Phytopathology**, v.57, p.311-314, 1967.
- DAVIS D. Partial control of *Fusarium* wilt in tomato by formae of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.58, p.121-122, 1968.
- DHINGRA, O. D., SINCLAIR, J. B. **Basic Methods in Plant Pathology**, 2Ed. Lewis Publishers, 1995. 434p.
- DIAZ-MINGUEZ, J. M., ALVES-SANTOS, F. M., BENEDITO, E. P., ESLAVA, A. P. *Fusarium* wilt of common bean in the Castilla y Leon region of Spain. **Plant Disease**, v.80, n.3, p.600, 1996.
- DONGO, S. L., MULLER, L. E. Estudio sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en frijol. II. Pruebas varietales. **Turrialba**, v.19, n.1, p.82-90. 1969.
- DUFFY, B., SHOUTEN, A., RAAIJMAKERS, J. M. Pathogen self-defense: Mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.501-538, 2003.
- DUIJFF, B. J., MEIJER, J. W., PETER, A. H. M. Siderophore-mediated competition for iron and induce resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Netherland Journal Plant Pathology**, v.99, p.277-289, 1993.
- DUIJFF, B. J., POUHAIR, D., OLIVAIN, C., ALABOUVETTE, C., LEMANCEAU, P. Implication of systemic induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **European Journal of Plant Pathology**, v.104, n.9, p.903-910, 1998.
- DUIJFF, B. J., RECORBET, G., PETER, A. H. M. BAKKER, J. E. L. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. **Biological Control**, v.89, n.11, p.1073-1079, 1999.
- DUQUE, S. M., MULLER, L. E. Estudio sobre la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaeoli* en el frijol. I. Patogénesis e histología sintomatológica. **Turrialba**, v.19, n.1, p.71 -81, 1969.
- ECHANDI, E. Amarillamiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Turrialba**, v.17, p.409-410, 1967.

- EDEL, V., STEINBERG, C., GAUTHERON, N., ALABOUVETTE, C. Populations of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* associated with roots of four plant species compared to soilborne populations. **Ecology and Population Biology**, v.87, n.7, p.693-697, 1997.
- GOULART, A. C. P. Doenças do feijoeiro na região norte de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, p.230-232, 1988.
- GRIFFIN, D. M. **Ecology of Soil Fungi**. Syracuse University Press, 1972. 193p.
- GULLINO, M. L., MIGHELI, Q., MEZZALAMA, M. Risk analysis in the release of biological control agents, antagonistic *Fusarium oxysporum* as a case study. **Plant Disease**, v.79, n.12, p.1193-1201, 1995.
- HERVÁS, A. TRAPERO-CASA, J. L., JIMÉNEZ-DÍAS, R. M. Induced resistance against *Fusarium* wilt of chickpea by nonpathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonpathogenic isolates of *F. oxysporum*. **Plant Disease**, v.79, p.1110-1116, 1995.
- HERVÁS, A., LANDA, B., DATNOFF, L. E., JIMENEZ, D. R. M. Effects of commercial and indigenous microorganisms on *Fusarium* wilt development in chickpea. **Biological Control**, v.13, n.3, p.166-176, 1998.
- KARUNANITHI, K., MOHAMED, U. K. Screening of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* causing wilt in sesamum. **Crop Research Hisar**. v.18, n.1, p.127-130, 1999.
- KENDRICK, J. B., SNYDER, W. C. *Fusarium* yellows of beans. **Phytopathology**, v.32, n.11, p.1010-1014, 1942.
- KLOEPPER, J. W., SCHROTH, M. N., MILLER, T. D. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. **Phytopathology**, v.70, p.1078-1082, 1980.
- KOMADA, H. Biological control of *Fusarium* wilts in Japan. In: HORNBY, D. (Ed.) **Biological Control of Soil Borne Plant Pathogens**. Wallingford, U.K. CAB, p.65-75, 1990.
- LANDA, B. B., MAVRODI, O. V., RAAIJMAKERS, J. M. Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. **Applied and Environmental Microbiology**. v.68, n.7, p.3226-3237, 2002a.
- LANDA, B. B., CACHINERO, D. J. M., LEMANCEAU, P. Effect of fusaric acid and phytoanticipins on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.11, n.48, p.971-985, 2002b.

- LARKIN, R. P., HOPKINS, D. L., MARTIN, F. N. Suppressive of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil. **Phytopathology**, v.86, n.8, p.812-819, 1996.
- LEE, K.E., PANKHURST, C.E. Soil Organisms and sustainable productivity. **Australian Journal Soil Research**, v.30, p.885-892, 1992.
- LEEMAN, M., DEN OUDEN, F. M., VAN PELT, J. A. Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. **Disease Control and Pest Management**, v.86, n.2, p.149-155, 1995.
- LEEMAN, M., DEN OUDEN, F. M., VAN PELT, J. A., CORNELISSEN, C., MATAMALA-GARROS, A., BAKKER, P. A. H. M., SCHIPPERS, B. Suppression of fusarium wilt of radish by co-inoculation of fluorescent *Pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.21-31, 1996.
- LEMANCEAU, P., ALABOUVETTE, C. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and non-pathogenic *Fusarium*. **Crop Protection**, v.10, p.279-286, 1991.
- LEMANCEAU, P., ALABOUVETTE, C. Suppression of *Fusarium* wilts by fluorescent *Pseudomonas*: mechanisms and applications. **Biocontrol Science and Technology**, v.3, p.219-234, 1993.
- LEMANCEAU, P., BAKKER, P. A .M., KOGEL, W. J., ALABOUVETTE, C., SHIPPERS, B. Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of *Fusarium* wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.9, p.2978-2982, 1992.
- LICHTHENTHALER, H. K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: COLOWICK, S. P., KAPLAN, N. O. **Methods in Enzimologic**, v.148. Academic Press, San Diego, p.350-382, 1987.
- LOUTER, J. H., EDGINTON, L. V. Indications of cross-protection against *Fusarium* crown and root rot of tomato. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p.283-288, 1990.
- MANDEEL, Q., BAKER, R. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.81, p.462-469, 1991.
- McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v.26, p.195-219, 1923.

- MINUTO, A., GARIBALDI, A., GULLINO, M. L. Biological control of *Fusarium* wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.) **Proceedings BCPC**, v.2, p.811-816, 1994.
- MINUTO, A. MIGHELI, Q., GARIBALDI, A. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection**, v.14, p.221-226, 1995.
- MISHRA, P. K., MUKHOPADHYAY, A. N., FOX, R. T. V. Integrated and biological control of gladiolus corn rot and wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. **Annals of Applied Biology**, v.173, n.3, p. 361-364, 2000.
- MUTITU, E. W., MUKUNYA, D. M., KEYA, S. O. Biological control of *Fusarium* yellows on beans caused by *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *phaseoli* Kendrik and Snyder using organic amendments locally available in Kenya. **Acta Horticulture**, v.218, p.267-274, 1988.
- NAUTIYAL, C. S. Selection of chickpea rhizosphere competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI1303 antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, *Rhizoctonia bataticola* and *Pythium* sp. **Current Microbiology**, v.35, p.52-58, 1997a.
- NAUTIYAL, C. S. Rhizosphere competence of *Pseudomonas* sp. NBRI9926 and *Rhizobium* sp. NBRI9513 involved in the suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 23, p.145-158.1997b.
- OLIVAIN, C., ALABOUVETTE, C. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*. **New Phytology**, v.137, p.481-494, 1997.
- OYARZUN, P. J., POSTMA, J., LUTTIKHOLT, A. J. G. Biocontrol of foot and root rot in pea caused by *Fusarium solani* with nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates. **Canadian Journal of Botany**, v.72, p.843-852, 1994.
- PARKER, C. A., ROVIRA, A. D., MOORE, K. J., WONG, P. T. W. Ecology and management of soilborne plant pathogens. In: WELLER, D. M. **Application of Fluorescent *Pseudomonas* to Control Root Diseases**. St. Paul, p.137-140, 1983.
- PARK, C. S., PAULITZ, T. C., BAKER, R. Biocontrol of *Fusarium* wilt of cucumber resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. **Phytopathology**, v.78, n.2, p.190-194, 1988.

- PASTOR-CORRALES, M. A., ABAWI, G. S. Reactions of selected bean germplasms to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. **Plant Disease**, v.71, n.11, p.990-993, 1987.
- PAULITZ, T.C. Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, p.401-413, 2000.
- POSTMA, J., LUTTIKHOLT, A. J. G. Benomyl-resistant *Fusarium* isolates in ecological studies on the biological control of *Fusarium* wilt in carnation. **Netherland Journal Plant Pathology**, v.99, p.175-188, 1993.
- POSTMA, J., RATTINK, H. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with nonpathogenic *Fusarium* isolates. **Med. Fac. Landbouww. Rijksniv**, v.56, n.2, p.179-183, 1991.
- POSTMA, J., RATTINK, H. Biological control of *Fusarium* wilt of carnation with nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Botany**, v.70, p.1199-1205, 1992.
- RAAIJMAKERS, J. M., LEEMAN, M., VON OORSCHOT, M. M. P. Dose-response relationships in biological control of *Fusarium* wilt of radish by *Pseudomonas* spp. **Biological Control**, v.85, n.10, 1995.
- RAVA, C. A., SARTORATO, A., COSTA, J. G. C. Reação de genótipos de feijoeiro comum ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.2, p.269-300, 1996.
- REID, T. C., HAUSBECK, M. K., KIZILKAYA, K. Use of fungicides and biological controls in the suppression of *Fusarium* crown and root rot of asparagus under greenhouse and growth chamber conditions. **Plant Disease**, v.86, n.5, p.493-498, 2002.
- RIBEIRO, R. L. D., HAGEDORN, D. J. Screening for resistance and pathogenic specialization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, the causal agent of bean yellows. **Phytopathology**, v.69, p.272-276, 1979.
- RIFAI, M. A. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers**, n.116, 1969, 56p.
- SALGADO, M. O., SCHWARTZ, H. F., BRICK, M. A. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* in tepary beans (*Phaseolus acutifolius*). **Plant Disease**, v.78, p.375-370, 1994.
- SCHIPPERS, B., GAMS, W. **Soil-Borne Plant Pathogens**. Academic Press, London, 1979, 686p.

- SCHNEIDER, R. W. Effects of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *apii* and novel use of the Lineweaver-Burk double reciprocal plot technique. **Phytopathology**, v.74, p.646-653, 1984.
- SIMON, A., RIDGE, E. H. The use of ampicillin in a simplified medium for isolation of fluorescent *Pseudomonas*. **Journal Applied Bacteriology**, v.37, p.459, 1974.
- SNEH, B. Biological control of *Rhizoctonia* diseases: 2. Use of non-pathogenic isolates of *Rhizoctonia* in biological control. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.2, p.102-106, 1999.
- VIEIRA, C. Doenças e Pragas do Feijoeiro. **Imprensa Universitária**, UFV, 1988. 231p.
- WELLER, D. M., RAAIJMAKERS, J. M. GERDENER, B. B. M. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.40, p.309-348. 2002.
- YANG, C. H, CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.1, p.345-351. 2000.
- YOUSSEF, Y. A. Physiological aspects of *Fusarium* wilt of *Phaseolus vulgaris*. **Phytopath. Z.**, v.41, p.353-360, 1961.
- ZAMBOLIM, L., VIEIRA, C., ARAÚJO, G. A. A. Ocorrência de murcha-de-*Fusarium* em feijoeiros na Zona da Mata de Minas Gerais. **Fitopatologia Brasileira**, v.12, p.287-288, 1987.
- ZOINA, A., WOO, S. L., SORBO, G. DEL. Razze fisiologiche e gruppi di compatibilità vegetativa (VCG) in *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, **Ann. Facolt. Sci. Agr. Univ. Studi Napoli**, v.29, n.1, p.36-50, 1995.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1 - Resultados analíticos da análise do solo, coletado em um campo não cultivado, utilizado nos ensaios em vasos e tubetes em casa de vegetação.

pH		P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al
H ₂ O		mg/dm ³			cmol _c / dm ³			
5,19	-	99,6	39	-	4,45	0,18	0,00	3,3

SB	(t)	(T)	V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
cmol _c / dm ³			%			dag/Kg	mg/L	mg/dm ³					
4,73	4,73	8,03	58,9	0,0	-	2,64	56,9	9,02	44,0	68,2	0,33	-	-

pH em água, kCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

P - Na - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich 1

Ca - Mg - Al - Extrator: KCL - 1 mol/L

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0

B - Extrator água quente

S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

V = Índice de Saturação de Bases

m = Índice de Saturação de Alumínio

ISNa - Índice de Saturação de Sódio

Mat. Org. (MO) = C. Org x 1,724 - Walkley-Black

P-rem = Fósforo Remanescente

Quadro 2 - Resultados analíticos da análise do solo, coletado na área onde foi instalado o infectário, para o ensaio de campo.

pH		P	K	Na	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al
H ₂ O		mg/dm ³			cmol _d / dm ³			
-	-	-	-	-	-	-	-	-

SB	(t)	(T)	V	m	ISNa	MO	P-rem	Zn	Fe	Mn	Cu	B	S
cmol _d / dm ³			%			dag/Kg	mg/L	mg/dm ³					
-	-	-	-	-	-	-	43,7	10,71	36,4	64,2	4,34	-	-

pH em água, KCl e CaCl₂ - Relação 1:2,5

P - Na - K - Fe - Zn - Mn - Cu - Extrator Mehlich 1

Ca - Mg - Al - Extrator: KCL - 1 mol/L

H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0

B - Extrator água quente

S - Extrator - Fosfato monocálcico em ácido acético

SB = Soma de Bases Trocáveis

CTC (t) - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva

CTC (T) - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0

V = Índice de Saturação de Bases

m = Índice de Saturação de Alumínio

ISNa - Índice de Saturação de Sódio

Mat. Org. (MO) = C. Org x 1,724 - Walkley-Black

P-rem = Fósforo Remanescente