SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS À
FERRUGEM (*Uromyces phaseoli* (REBEN.) WINT.)
DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

MARIA APARECIDA PESSÔA DA CRUZ CENTURION
engenheiro agrônomo

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Uni-
versidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia, Área
de Concentração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1990

Centurion, Maria Aparecida Pessoa da Cruz
C397s Seleção de microrganismos antagônicos à ferrugem
(Uromyces phaseoli (Reben.) Wint.) do feijoeiro
(Phaseolus vulgaris L.). Piracicaba, 1990.
116p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Feijão - Doença - Controle biológico 2. Ferrugem do feijão 3. Fungo - Potencial antagônico 4. Fungo para controle biológico I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS À FERRUGEM (*Uromyces phaseoli* (REBEN.) WINT.) DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

MARIA APARECIDA PESSÔA DA CRUZ CENTURION

Aprovada em: 16/10/90

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Hiroshi Kimati

Dr^a Raquel Ghini

Dr. Wagner Bettiol

Prof^a Dr^a Lilian Amorin

Prof. Dr. Clélio Lima Salgado

ESALQ/USP

EMBRAPA/CNPDA

EMBRAPA/CNPDA

ESALQ/USP

ESALQ/USP

Prof. Dr. Hiroshi Kimati
Orientador

Aos meus pais

Rubens e Amélia

e à minha irmã Mara

OFEREÇO

À minha filha

Lilian Maria e ao meu

marido José Frederico

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Hiroshi Kimati, pelas sugestões e segura orientação durante o desenvolvimento do presente trabalho.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pela oportunidade proporcionada para realização do Curso de Pós-Graduação.

À Universidade Estadual Paulista - Campus de Ilha Solteira, pela liberação para cursar a Pós-Graduação a nível de doutorado.

Ao Dr. Wagner Bettiol, pelo fornecimento dos isolados de *Bacillus subtilis* testados.

Ao Prof. Gener Tadeu Pereira, pela orientação nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. José Frederico Centurion, pelas sugestões e auxílio nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Manoel Vitor Franco Lemos, pela confecção do Summary.

À Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello", pelo auxílio prestado na identificação dos isolados de bactérias antagonicas.

Aos professores do Departamento de Fitotecnia da Universidade Estadual Paulista - Campus de Jaboticabal, pelo auxílio prestado durante a redação do trabalho.

Ao convênio CAPES/PICD/UNESP e ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Controle biológico de doenças através do emprego de antagonistas.....	5
2.2. Controle biológico da ferrugem do feijoei- ro.....	11
2.3. A cultura da folha destacada.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Isolamento e conservação de possíveis an- tagonistas da filosfera e do solo.....	17
3.2. Coleta e acondicionamento de folhas para cultura da folha destacada.....	18
3.3. Obtenção e manutenção de esporos de <i>U.</i> <i>phaseoli</i>	19
3.4. Seleção preliminar de microrganismos anta- gônicos.....	20
3.5. Efeito da aplicação dos antagonistas em diferentes concentrações.....	22
3.6. Formas de atuação dos antagonistas sobre <i>U. phaseoli</i>	23
3.7. Efeito da concentração de NaCl adicionado ao meio de cultura sobre a eficiência da bactéria antagônica B206.....	25
3.8. Termoequilíbrio dos metabólitos antagô- nicos.....	26

3.9. Efeito residual dos isolados de bactérias antagônicas.....	26
3.10. Determinação do poder erradicante dos isolados de bactérias antagônicas sobre <i>U. phaseoli</i>	27
3.11. Identificação dos microrganismos antagônicos.....	29
3.12. Análises estatísticas.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Seleção preliminar de microrganismos antagonicos.....	31
4.2. Efeito da aplicação de antagonistas em diferentes concentrações.....	36
4.3. Formas de atuação dos antagonistas sobre <i>U. phaseoli</i>	45
4.4. Efeito da concentração de NaCl adicionado ao meio sobre a eficiência da bactéria antagônica B206.....	53
4.5. Termoequilíbrio dos metabólitos antagônicos.....	58
4.6. Efeito residual dos isolados de bactérias antagônicas.....	60
4.7. Poder erradicante dos isolados de bactérias antagônicas.....	65
4.8. Identificação dos isolados de bactérias antagônicas.....	67
4.9. Considerações finais.....	70
5. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
7. APÊNDICE.....	85

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Efeito de bactérias isoladas do filoplano e do solo (B) e dos isolados de <i>Bacillus subtilis</i> (W) no desenvolvimento de pustulas de ferrugem (<i>Uromyces phaseoli</i>) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.....	32
Tabela 2. Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 1 (B96, B175, B187 e B206) em diferentes concentrações.....	37
Tabela 3. Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 2 (B106, B132, B138 e B196) em diferentes concentrações.....	38
Tabela 4. Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolado de bactéria antagônica do grupo morfológico 3 (B11) em diferentes concentrações.....	39
Tabela 5. Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulve-	

rizadas com isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 4 (W48, W85, W401 - já identificados como *Bacillus subtilis*) em diferentes concentrações.....40

Tabela 6. Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolados de bactérias antagônicas de diferentes grupos morfológicos (B138, B206 e W401) em diferentes concentrações.....41

Tabela 7. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas e de filtrados de culturas de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em BD e NY0.....46

Tabela 8. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas dos isolados de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B201 e B138 em BD e NY0.....47

Tabela 9. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização dos filtrados das culturas dos isolados de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em BD e NY0.....48

- Tabela 10. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas e de filtrados das culturas de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em BD.....49
- Tabela 11. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas e de filtrados das culturas de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em NYO.....50
- Tabela 12. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas do isolado B206 em NY com diferentes concentrações de NaCl e seus filtrados.....54
- Tabela 13. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas do isolado B206 em NY com diferentes concentrações de NaCl.....55
- Tabela 14. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização dos filtrados das culturas do isolado B206 em NY com diferentes concentrações de NaCl.....56

- Tabela 15. Comparação de médias de porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização de culturas dos isolados de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*) e B206 nas formas não-autoclavada, autoclavada e filtrada.....59
- Tabela 16. Médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a inoculação de *Uromyces phaseoli* em diferentes intervalos de tempo após a pulverização com as bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*) e B138.....64
- Tabela 17. Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas no teste efetuado para se verificar o efeito erradicante dos isolados de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138.....66
- Tabela 18. Características culturais, morfológicas, bioquímicas e de crescimento utilizadas na identificação do isolado B138 selecionado pela capacidade de inibir a formação de pústulas de *Uromyces phaseoli* em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.....68
- Tabela 19. Características culturais, morfológicas, de crescimento, bioquímicas e de resis-

tência térmica utilizadas na identificação do isolado B206 selecionado por sua capacidade em inibir a formação de pústulas de *Uromyces phaseoli* em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.....69

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Efeito residual do isolado da bactéria antagônica B187.....	62
Figura 2. Efeito residual do isolado da bactéria antagônica B206.....	63

SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS ANTAGÔNICOS À FERRUGEM
(*Uromyces phaseoli* (REBEN.) WINT.) DO FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.)

Autor: MARIA APARECIDA PESSÔA DA CRUZ CENTURION

Orientador: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

RESUMO

A seleção de antagonistas efetuada comprovou a existência de microrganismos habitantes do filoplasma e do solo com capacidade de inibir a formação de pústulas de ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*). Dentre os fungos, actinomicetos e bactérias testados, destacaram-se as bactérias *Arthrobacter* sp, isolado B138, *Bacillus* sp, isolado B206, e *Bacillus subtilis*, isolado W401.

B. subtilis, *Bacillus* sp e *Arthrobacter* sp apresentaram-se eficientes quando aplicados em suspensões concentradas de células em solução aquosa de Tween 20, 0,01%, reduzindo em mais de 95% o número de pústulas de ferrugem do feijoeiro. Suspensões com baixas concentrações de células ainda proporcionaram uma redução superior a 80% no número de pústulas de ferrugem nas folhas pulverizadas com *B. subtilis* e *Bacillus* sp e de cerca de 70%, nas folhas pulverizadas com *Arthrobacter* sp.

A aplicação da cultura líquida de *B. subtilis* e *Bacillus* sp também reduziu em mais de 95% o número de pústulas de ferrugem do feijoeiro. *Arthrobacter* sp aplicado em meio líquido foi menos eficiente do que *B. subtilis* e *Bacillus* sp, reduzindo em cerca de 65% o número de pústulas de ferrugem.

O isolado de *B. subtilis* libera para os meios de cultura líquidos, BD e NYO, substâncias termoes-

táveis com ação antagônica sobre *U. phaseoli*, uma vez que tanto a cultura líquida, como o filtrado e a cultura autoclavada reduziram em mais de 95% o número de pústulas de ferrugem do feijoeiro. *Bacillus* sp também libera substâncias antagônicas termoeestáveis para o meio de cultura que inibem *U. phaseoli*, mas a maior eficiência é observada quando se aplica o antagonista vivo. A produção de substâncias antagônicas por *Bacillus* sp é influenciada pela concentração de NaCl presente no meio de cultura. *Arthrobacter* sp não atua através da antibiose.

Os isolados de *B. subtilis* e *Bacillus* sp em suspensão concentrada afetam parcialmente a viabilidade dos esporos de *U. phaseoli* quando aplicados sobre pústulas de ferrugem do feijoeiro.

B. subtilis e *Arthrobacter* sp, testados em casa-de-vegetação, apresentaram-se eficientes na redução do número de pústulas de ferrugem por um período de tempo maior do que o isolado de *Bacillus* sp.

A técnica da folha destacada utilizada nos testes efetuados no laboratório facilitou a seleção de microrganismos antagônicos, permitindo obter-se uniformidade tanto nas pulverizações com o antagonista como nas inoculações com *U. phaseoli*, controle eficiente das condições ambientes durante o período de incubação e economia de espaço.

SELECTION OF ANTAGONISTIC MICROORGANISMS TO BEAN RUST
(*Uromyces phaseoli* (REBEN.) WINT)

Author: MARIA APARECIDA PESSÔA DA CRUZ CENTURION

Adviser: Prof. Dr. HIROSHI KIMATI

SUMMARY

The selection of antagonists to *U. phaseoli* conducted has detected the existence of microorganisms inhabiting the phylloplane and soil, exhibiting the ability to inhibit the formation of bean rust pustules (*U. phaseoli*). Among the tested actinomycetes, fungi and bacteria the following bacteria isolates were scored as best inhibitors: *Arthrobacter* sp B138, *Bacillus* sp B206 and *Bacillus subtilis* W401.

B. subtilis, *Bacillus* sp and *Arthrobacter* sp showed to be efficient when used as concentrated cell suspensions on aqueous Tween 20, 0,01% solutions, decreasing more than 95% the bean rust pustules number. Low concentrated suspensions still were able to decrease over 80% of the bean rust pustules number on the leaves sprayed with *B. subtilis* and *Bacillus* sp, while the *Arthrobacter* isolate has reduced 70% on the same conditions.

The use *B. subtilis* and *Bacillus* sp liquid cultures has also reduced more than 95% the bean rust pustules. When *Arthrobacter* was used as liquid culture it was less efficient than *B. subtilis* and *Bacillus* sp, showing a reduction rate of 65%.

The *B. subtilis* isolate releases to the culture media PD and NYO, thermostable substances with antagonistic action on *U. phaseoli*, since even the liquid culture as well as its filtrate and the autoclaved cul-

ture reduced in more than 95% the bean rust pustule number. *Bacillus* sp also acts through thermostable substances released to the culture medium, but the highest efficiency is observed when the antagonist is used alive. The production of antagonistic substances by *Bacillus* sp is influenced by the NaCl concentration present in the culture medium. *Arthrobacter* sp does not act through antibiosis.

The *B. subtilis* and *Bacillus* sp isolates at concentrated suspension affected partially the spores viability of *U. phaseoli* when used over the bean rust pustules.

The detached leaf technique used at the laboratory assays has made easier the selection of antagonistic microorganisms, allowing uniformity on the spraying with the antagonist as well as with *U. phaseoli*, efficient control of environmental conditions during the incubation period and in space saving.

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representa para o Brasil, antes de seu caráter econômico, um elemento de alto significado social, uma vez que é um dos alimentos básicos, principalmente para as classes de renda mais baixa.

O Brasil, juntamente com a China e a Índia, têm sido responsáveis por mais da metade do total de feijão produzido no mundo (MOURA, 1982). O Brasil é o terceiro país produtor mundial, mas comparando-o com a China, a Índia, o México e os Estados Unidos (dois outros grandes produtores), situa-se em quarto lugar quanto à produtividade, com cerca de 450-500 kg/ha, que é também inferior ao rendimento médio mundial de feijão (MOURA, 1982). Apesar do Brasil ser um dos maiores produtores de feijão, sua produção destina-se ao consumo interno e em muitos anos há necessidade de se importar o produto (MOURA, 1982 e VIEIRA, 1983a).

São várias as justificativas para os baixos rendimentos que a cultura do feijoeiro apresenta, como a extrema sensibilidade às variações climáticas, falta de política de apoio governamental constante e a longo prazo, uso de terras pouco férteis e mais acidentadas, baixo ou quase nulo uso de sementes com origem e qualidade controladas, predominância de cultivos consorciados com outras culturas e alta sensibilidade a pragas e doenças (EMBRAPA, 1981 e VIEIRA, 1983b).

As doenças constituem um dos fatores mais

importantes que interferem no baixo rendimento da cultura do feijoeiro (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978; SANDERS & SCHWARTZ, 1980; EMBRAPA, 1981; ZAMBOLIM et alii, 1982). Dentre as doenças, destaca-se como uma das mais prejudiciais, a ferrugem (*Uromyces appendiculatus*, também denominado *Uromyces phaseoli* ou *Uromyces phaseoli* var. *typica*) devido à sua ocorrência generalizada em todas as áreas produtoras de feijão e à freqüência com que ocorre (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; ZAMBOLIM & CHAVES, 1978; SANDERS & SCHWARTZ, 1980; ZAMBOLIM et alii, 1982 e VIEIRA, 1983b).

Os prejuízos causados pela ferrugem são variáveis, sendo maiores nos períodos de pré-floração e florescimento. As estimativas de perdas causadas pela ferrugem atingem em média 45% na produção de grãos nos vários países da América Latina (ZAMBOLIM et alii, 1982). No Brasil já foram relatados prejuízos de 100% (NASSER, 1976); de 67,6% (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978) e de 11 a 46% (CARRIJO et alii, 1979).

Visando reduzir os prejuízos causados pela ferrugem, várias medidas de controle são recomendadas. Práticas culturais como rotação de culturas, eliminação de restos culturais (ZAUMEYER & THOMAS, 1957; VARGAS, 1980; ZAMBOLIM et alii, 1982 e VIEIRA, 1983b) e redução da densidade de semeadura (VARGAS, 1980) são recomendadas. Recomenda-se também 3 ou 4 pulverizações, em média, com fungicidas protetores como enxofre, maneb, mancozeb, chlorothalonil, captafol, metiram, zinco e acetato de trifenil estanho (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978; VARGAS, 1980 e ZAMBOLIM et alii, 1982) ou duas aplicações com fungicidas sistêmicos como oxicarboxin ou mistura de oxicarboxin e carboxin (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978; VARGAS, 1980 e ZAMBOLIM et alii, 1982). O emprego de variedades resistentes é a prática mais eficiente e econômica no controle de fer-

rugem do feijoeiro (ZAMBOLIM et alii, 1982).

Entretanto, todas as medidas de controle mencionadas apresentam problemas para sua aplicação prática. As medidas culturais são de eficiência duvidosa e a aplicação de fungicidas pode não ser economicamente viável devido ao alto custo do produto e ao risco da cultura (KIMATI, 1980a), além da possibilidade de desenvolvimento de raças do patógeno resistentes aos fungicidas (BAUER, 1978). O emprego de variedades resistentes é dificultado pela sua escassez (ZAMBOLIM et alii, 1982). Essa escassez justifica-se pelas dificuldades existentes no uso da resistência vertical. As raças fisiológicas do fungo podem variar de local para local e mesmo de ano para ano, dependendo de vários fatores, de tal forma que uma variedade que é resistente numa localidade, pode ser altamente suscetível em outra (ZAMBOLIM & CHAVES, 1978). Vários pesquisadores caracterizaram e descreveram vários patótipos verticais e apesar das dificuldades de comparação dos resultados obtidos em diversas regiões e entre pesquisadores, a ampla variação natural na população do patógeno está representada pela descrição de 169 patótipos verticais de *U. phaseoli* (MENTEN, 1980). A resistência horizontal constitui-se uma alternativa mais segura, porém, devido à problemas associados à sua identificação, herança geralmente poligênica e influência do ambiente em sua manifestação, os pesquisadores não a tem utilizado em seus programas de melhoramento (VAN DER PLANK, 1963; VAN DER PLANK, 1968 e ROBINSON, 1971).

Considerando a importância da ferrugem e as dificuldades existentes no emprego das diversas alternativas de controle já estudadas e recomendadas, atualmente vem sendo considerada a possibilidade de controlar a ferrugem do feijoeiro através do emprego de antagonistas, podendo tornar-se prática disponível ao agricultor,

se for bem sucedido. Para tanto há necessidade de concentrar esforços no sentido de se obter informações sobre esta modalidade de controle.

De acordo com ANDREWS (1985), o sucesso de um programa de controle biológico através de antagonistas depende da disponibilidade destes. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo verificar a presença de antagonistas a *U. phaseoli* no filoplano e no solo, selecionar os antagonistas com base na eficiência de redução no número de pústulas de ferrugem considerando diferentes aspectos (concentração do antagonista, formas de atuação, termoestabilidade dos metabólitos antagônicos, efeito residual e poder erradicante dos antagonistas) e identificar os antagonistas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Controle biológico de doenças através do emprego de antagonistas

O controle biológico de doenças de plantas foi empregado desde há muito tempo (cerca de 10.000 anos) pelos iraqueanos, egípcios, chineses, incas da América do Sul, romanos e europeus através de práticas empíricas que se usavam para aumentar a produção de alimentos (COOK & BAKER, 1983).

Apesar de ser uma prática milenar entre os agricultores, o controle biológico de doenças de plantas iniciou-se como ciência recentemente com o trabalho sobre os fatores que afetam a patogenicidade do agente causal da sarna da batata, publicado por G. B. Sanford em 1926. Em 1931, Sanford e Broadfoof empregaram pela primeira vez o termo "controle biológico" em um artigo sobre o mal-do-pé do trigo (COOK, 1985).

O controle biológico de doenças foi inicialmente definido por BAKER & COOK (1974) como sendo "a redução da "densidade de inóculo" ou "atividades determinantes da doença" de um patógeno ou parasita em seu estágio ativo ou dormente, por um ou mais organismos, efetuada naturalmente ou através da manipulação do ambiente, hospedeiro ou antagonista, ou por introdução em massa de um ou mais antagonistas".

COOK (1977), referindo-se ao conceito apre-

sentado por BAKER & COOK (1974) explica que os autores consideram principalmente a manipulação de microrganismos competitivos ou antagônicos aos patógenos quando sua interação natural reduz ou previne as doenças de plantas.

COOK & BAKER (1983) simplificaram a definição apresentada em 1974 para a seguinte forma "controle biológico de doença de planta é a redução da quantidade de inóculo ou das atividades determinantes de doença de um patógeno, efetuada por ou através de um ou mais organismos, exceto o homem". Os referidos autores explicam que o termo "atividades determinantes de doença", envolve crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras qualidades do patógeno ou processos que determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Os organismos incluem indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas dentro da própria espécie patogênica; o hospedeiro manipulado geneticamente ou por práticas culturais ou com microrganismos que levam à maior ou mais eficiente resistência ao patógeno; e antagonistas aos patógenos, definidos como microrganismos que interferem com a sobrevivência ou "atividades determinantes de doenças". Desta forma, o controle biológico pode ser efetuado através de práticas culturais que criem um ambiente favorável ao antagonista, à resistência da planta hospedeira ou a ambos; através do melhoramento de plantas visando resistência ao patógeno ou visando adequar a planta hospedeira para as atividades do antagonista; e através da introdução em massa do antagonista, linhagens não patogênicas ou outros agentes ou microrganismos benéficos.

O conceito de controle biológico de doenças foi simplificado ainda mais por COOK (1985) como sendo "o uso de alguns organismos para o controle de um patógeno". COOK (1985) reafirma que estão incluídos como organismos as plantas superiores e os microrganismos, considerando

também a resistência do hospedeiro como um dos melhores e mais eficientes controles biológicos.

COOK (1985) mencionou que essa definição tão ampla tem sido alvo de críticas, pois dessa forma os fitopatologistas que trabalham com controle biológico teriam uma solução para seus insucessos, já que poderiam contar com o uso bem sucedido das práticas culturais e o melhoramento visando resistência. COOK (1985) discutiu a necessidade de um amplo conceito, argumentando ser este necessário não para aumentar as realizações do controle biológico, mas sim para expandir as opções para o futuro. Exemplificando a necessidade desse amplo conceito, considerou o caso de um gene que regula a produção de uma substância inibidora para um patógeno. Se esse gene é carregado e expresso em uma célula de uma bactéria que coloniza uma raiz e que a bactéria, quando aplicada em um tratamento de semente coloniza e protege a raiz daquela planta, certamente isso é controle biológico. Se entretanto a engenharia genética maneja e transfere esse gene para o interior do genoma de uma planta e ele se expressa por inibidores liberados com os exsudatos de raízes, afirma o autor que isso também deveria ser chamado de controle biológico. Esse mesmo raciocínio poderia ser empregado em relação às práticas culturais como medidas de controle biológico, já que a rotação de cultura combinada com arações permitem ou aceleram a degradação biológica do inóculo tanto quanto a introdução de um hiperparasita.

Entretanto, a inclusão da resistência do hospedeiro e das práticas culturais no conceito de controle biológico não modifica o fato destas medidas já estarem consagradas, sendo que o mesmo não pode se afirmar no que se refere ao controle biológico através do emprego de antagonistas, pois ainda faltam pesquisas nessa área.

O termo antagonista é empregado para desig-

nar agentes biológicos com potencial para interferir no processo de vida dos fitopatógenos. Podem ser incluídos como antagonistas todas as classes de microrganismos: fungos, bactérias, nematóides, protozoários, vírus, vi-róides e sementes de plantas (por exemplo, plantas arma-dilhas) (COOK & BAKER, 1983).

Já estão definidas algumas categorias de a-tuação do antagonista. A antibiose é representada por a-gentes metabólicos produzidos por organismos com efeitos prejudiciais sobre outros (Jackson, citado por PARK, 1960). A exploração é o termo usado para indicar predação ou parasitismo direto (BOOSALIS & MANKAU, 1965). A compe-tição refere-se à demanda de suprimento de material ou condição por parte de dois ou mais microrganismos (BAKER, 1968).

Segundo COOK (1985) pode-se utilizar três amplas estratégias no controle biológico: a) controle biológico do inóculo do patógeno; b) proteção biológica da superfície da planta; e c) controle biológico através da indução de resistência ou proteção cruzada. O controle biológico do inóculo do patógeno ocorre longe da planta hospedeira e envolve a destruição ou mutilação do inóculo do patógeno ou a prevenção de sua formação promovidos por rotação de culturas, arações e aplicação de antagonistas em pré-plantio ou no sulco de plantio. A proteção bioló-gica da superfície da planta ocorre sobre a planta e agrupa a maior parte dos sucessos recentes do controle biológico pela introdução de antagonistas. A indução de resistência ou proteção cruzada ocorre dentro da planta e inclui a única forma prática de controle biológico atra-vés de antagonistas para as viroses e patógenos vascula-res, os quais permanecem a maior parte ou todo o seu ci-clo de vida dentro do hospedeiro. Um exemplo do emprego bem sucedido dessa última estratégia, com utilização co-

mercial é o controle da tristeza dos citros no Brasil e na Austrália através de uma linhagem fraca do vírus da tristeza descoberta e testada por COSTA & MÜLLER (1980).

Os promissores resultados da pesquisa envolvendo antagonistas para o controle biológico somam um grande número: controle de *Heterobasidion annosum* por *Peniophora gigantea* aplicado em ferimentos de pinheiros (RISHBETH, 1963); aumento de produção de culturas por tratamento de sementes com a linhagem Al3 de *B. subtilis* para proteger contra patógenos de raízes (BROADBENT et alii, 1971); controle da galha da coroa das rosáceas (*Agrobacterium radiobacter* var. *tumefasciens*) por *Agrobacterium radiobacter*, linhagem K84 (KERR, 1980); controle de podridão de raízes do mamoeiro (*Phytophthora palmivora*) por microrganismos habitantes de solos de floresta (KO, 1971; KO, 1982); rizobactérias promotoras de crescimento de plantas aplicadas em batata, beterraba e outras culturas para protegê-las contra patógenos de raiz (SUSLOW & SCHROTH, 1982); controle do mal-do-pé e da podridão de raízes do trigo por bactérias do tipo pseudomonas fluorescentes (BECKER & COOK, 1984; WELLER & GRAHAM, 1984); controle da podridão parda do pêssego (*Monilinia fructicola*) por *B. subtilis* (PUSEY & WILSON, 1984), controle de bacteriose em milho (*Pseudomonas avenae*) por *Pseudomonas fluorescens* (LOPES & STALL, 1986); controle de *Rhizoctonia solani* em soja por *Trichoderma harzianum* (HOMECHIN, 1987).

Apesar dos inúmeros resultados promissores obtidos até então, poucos são os exemplos de aplicação prática destas medidas de controle. Isso faz com que alguns autores refiram-se ao controle biológico de doenças como uma área de estudo fascinante e desafiante, mas por outro lado desilusiva e frustrante (SCHROTH & HANCOCK, 1981).

GINDRAT (1983) aponta dois elementos importantes para a transição experimentação - prática no controle biológico: a) o antagonista deve ser eficiente e de rápida instalação no local de infecção: b) ausência de método químico concorrente e de eficácia comparável. Portanto, a primeira etapa de uma pesquisa visando o controle de doenças através do emprego de antagonistas consiste na obtenção de antagonistas eficientes. COOK & BAKER (1983) recomendam que os antagonistas devem ser procurados em locais onde a doença causada por um determinado patógeno não ocorre, está em declínio ou não pode se desenvolver mesmo na presença do hospedeiro suscetível e do patógeno. Exemplos bem sucedidos de controle biológico como no caso da tristeza dos citros (COSTA & MÜLLER, 1980) e da galha da coroa em rosáceas (KERR, 1980) confirmam a recomendação feita por COOK & BAKER (1983).

Uma vez encontrado o antagonista eficiente, é imprescindível que ele se estabeleça e se multiplique rapidamente no local de infecção (GINDRAT, 1983). Desta forma, os antagonistas que são obtidos no mesmo "habitat" do patógeno devem ser preferidos para a utilização no controle biológico, uma vez que teriam maiores chances de sobrevivência (BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982).

A outra regra básica para que o antagonista seja utilizado na prática é a ausência de método químico concorrente e de eficácia comparável. A ineficácia dos produtos químicos tem sido verificada não só pela baixa porcentagem de redução no índice de doença, mas também pelo aparecimento de raças do patógeno resistentes e inviabilidade econômica para muitas doenças como as causadas por patógenos do solo, as murchas vasculares e as bacterioses (KIMATI, 1980b; JONES, 1982; KIMATI, 1987; KUROZAWA, 1987). As fitoviroses não podem ser controladas através de viricidas uma vez que estes não estão disponí-

veis (AGRIOS, 1988).

SCHROTH & HANCOCK (1981) concordam com GINDRAT (1983) no que se refere à necessidade de se obter um antagonista que se adapte facilmente, mas afirmam que é importante também que se escolha uma doença ideal. Consideram como doença ideal aquela em que a planta é suscetível durante um curto período, o agente causal é um habitante não vigoroso do solo, o organismo permanece localizado após a infecção e não se torna sistêmico, e o ponto de infecção é relativamente não exclusivo, ou seja, um nicho ecológico facilmente colonizado por competidores. Os referidos autores citam como exemplo os "tombamentos de plântulas" já que o período de proteção necessário é relativamente curto e os agentes de biocontrole não necessitariam ser mantidos em alta população por mais de algumas semanas. O controle da podridão de raízes do mamoeiro (*Phytophthora palmivora*) no Hawaii, substituindo-se o solo da cova por solo de floresta, visa manter a planta fora do alcance do patógeno durante a fase de suscetibilidade (KO, 1982).

Com base nas experiências registradas durante cerca de 60 anos de pesquisa em controle biológico, GINDRAT (1983) tenta traçar algumas diretrizes, sugerindo como pontos chaves para pesquisas futuras o estudo de solos supressivos e o manejo integrado. COOK (1985) relata que seria pretencioso sugerir a direção para o futuro, entretanto afirma que ela seria variada, numerosa e limitada somente pela imaginação.

2.2. Controle biológico da ferrugem do feijoeiro

O controle biológico da ferrugem do feijoeiro através de antagonistas vem sendo estudado há alguns anos e os resultados obtidos são promissores.

STAVELY et alii (1981) observaram uma redução de vinte vezes no número de pústulas de ferrugem em folhas primárias de feijoeiro primeiramente pulverizadas com *Bacillus subtilis* e depois inoculadas com *U. phaseoli*. Verificaram que *B. subtilis* cultivado em "Eugon broth", a 30°C, foi igualmente eficiente na redução da severidade da ferrugem quando aplicado de 0 a 3 dias antes da inoculação com *U. phaseoli*. Testaram também o filtrado da cultura livre das células e células mortas de *B. subtilis* e observaram que em ambos os casos ocorreu redução na severidade da ferrugem, sendo que as células mortas foram tão eficientes quanto as células vivas e superiores em relação ao filtrado.

BAKER et alii (1983) verificaram a eficiência de dois isolados de *B. subtilis*, um isolado de *Bacillus cereus*, um de *Bacillus thuringiensis* e um de *Erwinia ananas* pv. *uredovora* no controle da ferrugem do feijoeiro em casa-de-vegetação. O isolado APPL-1 de *B. subtilis* foi o mais eficiente e reduziu em mais de 95% o número de pústulas de ferrugem quando aplicado de 2 a 120 horas antes da inoculação com *U. phaseoli* var. *typica*. Esta redução foi observada para os diferentes isolados de *U. phaseoli* em diferentes cultivares de feijoeiro testados. *B. subtilis*, isolado APPL-1, não reduziu o número de pústulas quando aplicado após a inoculação com os uredosporos de *U. phaseoli*. Observaram também a redução na germinação de uredosporos e produção de tubos germinativos anormais naqueles que conseguiram germinar.

Incentivados pelos resultados promissores obtidos em casa-de-vegetação, BAKER et alii (1985) deram continuidade ao trabalho e demonstraram que filtrados de culturas de dois isolados de *B. subtilis* (APPL-1 e PPL-3), com sete dias de idade reduziram em pelo menos 75% a severidade da ferrugem do feijoeiro em condições de cam-

po. Verificaram também que o isolado PPL-3 possui um efeito hormonal sobre as plantas tornando-as mais verdes e suculentas e diminuindo a produção.

Desde que os estudos sobre controle biológico da ferrugem do feijoeiro através do emprego de *B. subtilis* se iniciaram, tem-se efetuado tentativas para a determinação do componente inibidor.

STAVELY et alii (1981) verificaram que uma substância extraída de células de *B. subtilis*, "methilene chloride", apresentou a mesma redução verificada com a pulverização da bactéria cultivada em "Eugon broth", mas os precipitados de ácido tricloroacético e etanol não foram eficientes.

BAKER et alii (1983) efetuaram análises do filtrado de cultura de *B. subtilis*, as quais revelaram a presença de um componente inibidor não dializável e term estável. A fração dializável foi submetida a uma gel filtração e o eluído foi o responsável pela redução tanto da germinação dos uredosporos quanto do número de pústulas. Esse componente possui um peso molecular aparente de 5 a 10 kdaltons e aproximadamente 5% de carboidratos e 95% de proteínas.

Além de *B. subtilis*, tem se detectado a presença de fungos com efeitos antagônicos sobre *U. phaseoli*.

GONZÁLES AVILA & CASTELLANOS (1978) verificaram o fungo *Darluca filum* parasitando soros de ferrugem do feijoeiro e de outras plantas afetadas por outras espécies de Uredinales. Esses autores afirmaram que quando o cultivo de milho, uma das espécies em que o micoparasita foi detectado, precede o de feijão, em épocas de alta incidência de ferrugem, aumenta o parasitismo de *U. phaseoli* var. *typica*.

ALLEN (1982), estudando os efeitos de *Verti*

cillium lecanii sobre a ferrugem do feijoeiro, verificou que uma semana após a aplicação de conídios do referido fungo isolado dos uredosporos invadidos por micélio sobre pústulas de ferrugem do feijoeiro, estas tornavam-se recobertas pelo antagonista. Os uredosporos apresentavam-se invadidos por *V. lecanii*, entretanto, testes posteriores demonstraram a não ocorrência de lise. *V. lecanii* isolado de um afídeo também foi capaz de colonizar as pústula de ferrugem.

2.3. A cultura da folha destacada

Pelo fato da técnica da folha destacada ter sido utilizada durante diferentes etapas do presente trabalho, foram feitas algumas considerações sobre aspectos relacionados à metodologia e utilizações.

A cultura da folha destacada é definida como a manutenção de folhas vivas por um certo período após ter sido destacada da planta-mãe (YARWOOD, 1946; TUIITE, 1969).

Inicialmente esta técnica foi utilizada em estudos de fisiologia vegetal como absorção de água, transpiração, respiração e fotossíntese. Alguns anos após sua descoberta, os fitopatologistas começaram a utilizá-la para testes de inoculação e estudos de fisiologia do parasitismo (YARWOOD, 1946).

A cultura da folha destacada apresenta vantagens como economia de espaço; economia de material vegetal; economia de inóculo; facilidade e exatidão nas observações, uma vez que pode-se examinar o material sob microscópio sem prejudicar a cultura; redução na contaminação; uniformidade da unidade experimental; facilidade de controle e manipulação dos fatores ambientes; eliminação da necessidade de luz quando o cultivo é feito em

solução de sacarose; crescimento exuberante de alguns parasitas obrigatórios como ferrugens e oídios (YARWOOD, 1946; HOOKER & YARWOOD, 1966; TUIE, 1969; HENESSY & SACKSTON, 1970; MIGNUCCI, 1978).

Ao longo dos anos testaram-se diferentes métodos de cultivar a folha destacada, todos com uma característica em comum, a simplicidade. Um dos métodos consiste em se acondicionar as folhas em placas de Petri contendo uma camada de algodão recoberta com papel de filtro umedecidos (MIGNUCCI, 1978; MORAES, 1981; MENDES, 1985). Para gramíneas as folhas podem ser cultivadas em tubos de ensaio ou placas de Petri contendo solução de sacarose em água a 5% + solução de benzimidazol, 20 ppm (HOOKER & YARWOOD, 1966) ou somente solução de benzimidazol (BROWDER, 1964; WILCOXSON et alii, 1974). Outro método consiste em se utilizar a vermiculita para o enraizamento de folhas (NSUMBU & BOUHARMONT, 1977), ou areia (Watson, 1935, citado por YARWOOD, 1946; MIGNUCCI, 1978) ou solo (MIGNUCCI, 1978).

Por ser uma técnica simples que apresenta inúmeras vantagens, a cultura da folha destacada tem sido muito útil nas pesquisas envolvendo fitopatologia. Tem sido empregada especialmente para estudos do desenvolvimento de parasitas obrigatórios como *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, agente causal da ferrugem do trigo e *Microsphaera diffusa*, agente causal do mildio em soja (BROWDER, 1964; MIGNUCCI, 1978), para a determinação da resistência de diferentes genótipos como nas combinações alfafa/*Phoma herbarum* var. *medicaginis*, trigo/*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, amendoim/*Cercospora arachidicola* e *C. personata*, amendoim/*Puccinia arachidis* (WARD, 1959; WILCOXSON et alii, 1974; MORAES & SALGADO, 1982; MORAES & SAVY FILHO, 1983); para estudos das relações patógeno-hospedeiro, especialmente nos casos das ferrugens de di-

versas espécies vegetais como em milho, *Oxalis corniculata*, girassol e cevada (HOOKER & YARWOOD, 1966; HENESSY & SACKSTON, 1970; LUMBROSO et alii, 1977) e para a quantificação de parâmetros epidemiológicos monocíclicos da ferrugem do feijoeiro (MENDES, 1985).

O grande obstáculo para o uso da folha destacada está na ocorrência da morte precoce da folha. Entretanto, existem estudos demonstrando que sob condições ambientes adequadas, folhas de várias espécies como as de batata, menta, milho, maçã, fumo, feijão e outras, podem sobreviver por longos períodos (YARWOOD, 1946). Observou-se também que as folhas de dicotiledôneas podem permanecer vivas por um período de tempo maior do que as de monocotiledôneas (YARWOOD, 1946; HOOKER & YARWOOD, 1966). Para aumentar o período de sobrevivência das folhas de milho, HOOKER & YARWOOD (1966) adicionaram à solução em que as folhas foram mantidas, 5% de sacarose e 20 ppm de benzimidazol. Existem outras sugestões para aumentar o período de sobrevivência da folha destacada como coletar as folhas à tarde para que estas apresentem uma alta relação carboidratos/proteína, coletar somente folhas jovens ou de média idade com cuidado para que não murchem, preferir folhas provenientes de casa-de-vegetação, manter as folhas em recipientes fechados sob luz fluorescente e evitar altas temperaturas (YARWOOD, 1946; BROWDER, 1964; TUIITE, 1969).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento e conservação de possíveis antagonistas do filoplano e do solo

O isolamento de microrganismos do filoplano do feijoeiro foi efetuado a partir de folhas com e sem pústulas dos cultivares de feijoeiro, Carioca e Rosinha, de folhas com pústulas dos cultivares Rio Awaí, Carnaval, Rosinha e Emgopa, coletadas no campo experimental do Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP/Piracicaba/SP; e de folhas com pústulas do cultivar Carioca coletadas nos municípios de Jaboticabal/SP, Catanduva/SP, Taiuva/SP e Taiaçu/SP.

As amostras de solo utilizadas para o isolamento de microrganismos foram coletadas na camada superficial de uma área sem cultura, uma cultivada com feijoeiro cultivar Carioca, e outra cultivada com feijoeiro cultivar Rosinha, localizadas no campo experimental do Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP/Piracicaba/SP.

Os isolamentos foram efetuados através do plaqueamento de suspensões diluídas em série, a partir de uma suspensão preparada agitando-se manualmente 10 g de material (folhas ou solo) em 90 ml de água destilada e esterilizada.

As suspensões diluídas em série foram plaqueadas em meios seletivos para fungos (meio de Martin: KH_2PO_4 - 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5 g, peptona - 5 g, dextrose - 10 g, Rosa Bengal - 0,033g, ágar - 20 g, estreptomicina

- 0,05 g, água destilada - 1000 ml), para bactérias (NAY: peptona - 5 g, extrato de carne - 3g, NaCl - 8 g, extrato de levedura - 1 g, ágar - 20 g, água destilada - 1000 ml) e para actinomicetos (meio A: caseína hidrolizada - 0,3 g, KNO_3 - 2 g, NaCl - 2 g, K_2HPO_4 - 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 50 mg, CaCO_3 - 20 mg, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 10 mg, Mycostatin - 0,5%, ágar - 20 g, água - 1000 ml, pH = 7,0 a 7,2; meio B: ágar - água alcalinizado indicado por HO & KO, 1979).

O plaqueamento foi efetuado transferindo-se 0,1 ml da cada diluição para placas de Petri contendo os diferentes meios de cultura utilizados. Após a transferência, a suspensão foi espalhada sobre a superfície do meio de cultura com o auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida as placas foram incubadas em condições ambientes por sete dias. Após esse período efetuou-se um exame das colônias de microrganismos e as escolhidas através da morfologia (cor, forma, tamanho) foram repicadas para tubos de ensaio com meio de cultura e devidamente identificadas.

As culturas em tubos de ensaio foram conservadas em câmara fria, a cerca de 10°C até a realização dos testes de seleção de antagonistas.

Além dos microrganismos isolados da filosefera do feijoeiro e do solo foram incluídos nos testes de seleção 14 isolados de *B. subtilis* fornecidos pelo Dr. Wagner Bettiol (EMBRAPA/CNPDA), já selecionados para controle biológico de *Pyricularia oryzae*, que foram mantidos da mesma forma que os demais isolados.

3.2. Coleta e acondicionamento de folhas para cultura da folha destacada

As folhas utilizadas para os testes em laboratório foram destacadas de plantas de feijoeiro culti-

var Rosinha, cultivadas em casa-de-vegetação. As plantas foram coletadas 9 a 12 dias após a semeadura, estágio em que apresentavam o par de folhas primárias ainda jovens. A coleta foi efetuada no final da tarde como recomendado por TUIITE (1969) e as plantas foram imediatamente levadas para o laboratório, evitando-se assim a ocorrência de murchamento das folhas. No laboratório, o pecíolo imerso em água foi cortado com uma tesoura esterilizada próximo à inserção com o caulículo. Em seguida, o pecíolo foi envolvido em algodão umedecido com água destilada e a folha foi colocada em placa de Petri com diâmetro de 90 mm, contendo uma fina camada de algodão sob um disco de papel de filtro previamente umedecidos com 25 ml de água destilada. Colocou-se uma lâmina de vidro sob a folha para se evitar o contato direto desta com a superfície úmida do papel de filtro.

As folhas coletadas no final da tarde para serem utilizadas somente no dia seguinte foram mantidas durante a noite em uma câmara de crescimento com temperatura ajustada para, aproximadamente, 16°C.

Metodologia semelhante à utilizada no presente trabalho foi descrita por MORAES (1981) e MENDES (1985).

3.3. Obtenção e manutenção de esporos de *U. phaseoli*

Os esporos utilizados para iniciar a produção de inóculo de *U. phaseoli* foram coletados em feijoeiros do campo experimental do Departamento de Fitopatologia, ESALQ/USP/Piracicaba/SP e de uma lavoura localizada no município de Catanduva/SP.

Os uredosporos coletados foram transferidos com auxílio de um escalpelo esterilizado para a superfície inferior das folhas destacadas de feijoeiro, cultivar

Rosinha, acondicionadas em placas de Petri da forma descrita no item 3.2. Com o auxílio de um pincel embebido em solução 0,01% de Tween 20 em água, os uredosporos foram espalhados pela superfície da folha.

Sob a tampa da placa de Petri colocou-se um plástico transparente para assegurar que a umidade relativa no seu interior se mantivesse alta.

As folhas inoculadas foram mantidas no escuro por 48 horas a uma temperatura de 15-16°C. Após esse período permaneceram na câmara de crescimento sob luz fluorescente contínua, à temperatura de 16-20°C até o aparecimento das pústulas (cerca de 14 a 16 dias após a inoculação).

A manutenção dos uredosporos originários dos diferentes municípios foi efetuada através de inoculações quinzenais em folhas destacadas de feijoeiro, utilizando-se assim, para os testes, uredosporos recém formados.

3.4. Seleção preliminar de microrganismos antagônicos

A seleção preliminar de antagonistas para o controle biológico da ferrugem do feijoeiro foi efetuada em condições controladas, utilizando-se a técnica da folha destacada descrita no item 3.2.

O efeito dos diversos microrganismos isolados sobre a formação de pústulas de ferrugem foi efetuado inoculando-se o agente causal da doença, *U. phaseoli*, e logo após a secagem das gotículas da inoculação, pulverizou-se o microrganismo a ser testado. A aplicação de ambas as suspensões foi efetuada através de pulverizações uniformes com pulverizador DeVilbiss, tipo 15, sobre a superfície inferior das folhas de feijoeiro devidamente acondicionadas.

Os microrganismos isolados do filoplano, do solo e os isolados de *B. subtilis*, totalizando 249, foram cultivados em meio de cultura sólido por um período de cinco dias para as bactérias e de 10 a 15 dias para fungos e actinomicetos. Os meios de cultura utilizados foram os mesmos empregados durante o isolamento, ou seja, NAY para bactérias, meio de Martin para fungos e o meio A para actinomicetos conforme composição apresentada.

Tanto a suspensão de esporos de *U. phaseoli*, quanto a dos microrganismos isolados do filoplano do feijoeiro, do solo e as de *B. subtilis* foram preparadas em solução de Tween 20, 0,01%. A concentração de uredosporos de *U. phaseoli* foi ajustada para $2 \text{ a } 3 \times 10^4$ esporos/ml através da contagem em hemocitômetro. A concentração das suspensões dos microrganismos isolados do filoplano, do solo e as de *B. subtilis* foi determinada em colorímetro, com comprimento de onda ajustado para 625 nm, através da leitura da transmitância.

As testemunhas foram inicialmente pulverizadas com suspensão do patógeno e em seguida com uma solução de Tween 20, 0,01%.

Ao serem fechadas, as placas receberam um plástico transparente sob a tampa para manter alta a umidade relativa no seu interior. Em seguida, foram incubadas em câmara de crescimento à temperatura de 15-16° C e no escuro por 48 horas. Após esse período permaneceram na câmara de crescimento sob luz fluorescente contínua à temperatura de 16-20°C por 14 a 16 dias quando se procederam as avaliações.

Os microrganismos isolados do filoplano, do solo e os isolados de *B. subtilis* foram inicialmente testados em duas repetições e aqueles que mostraram-se eficientes na redução do número de pústulas de ferrugem foram novamente testados com quatro repetições para confir-

mar sua ação. Na primeira fase da seleção utilizaram-se os uredosporos de *U. phaseoli* provenientes de feijoeiro de Piracicaba/SP e na segunda fase de seleção, os uredosporos provenientes de Catanduva/SP.

Cada repetição constituiu-se por uma folha destacada e a distribuição das parcelas na câmara de crescimento foi feita inteiramente ao acaso.

As avaliações foram realizadas através de contagem do número de pústulas por folha nos diversos tratamentos. Com esses resultados foi possível calcular a porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem para cada tratamento.

3.5. Efeito da aplicação dos antagonistas em diferentes concentrações

O estudo do efeito da concentração das suspensões de bactérias antagônicas sobre a formação de pústulas de ferrugem foi efetuado inicialmente entre isolados de cada grupo morfológicamente semelhante que se mostraram mais eficientes na fase preliminar de seleção.

Os grupos testados compreenderam as seguintes bactérias antagônicas: Grupo 1 (colônias amarelas) - B96, B175, B187 e B206, Grupo 2 (colônias vermelhas) - B106, B132, B138, B196, Grupo 3 - B11 (colônia bege) e Grupo 4 (*B. subtilis*) - W48, W85 e W401.

Para isso as bactérias antagônicas selecionadas foram cultivadas em meio sólido NAY por cinco dias e a partir destas culturas prepararam-se suspensões com a mesma concentração testada durante a seleção preliminar e com concentrações superiores e inferiores. As concentrações das suspensões testadas foram determinadas em colorímetro com comprimento de onda ajustado para 625 nm.

Os testes foram realizados em folhas desta-

cadadas de feijoeiro cultivar Rosinha. Estas foram inicialmente pulverizadas com uma suspensão de esporos de *U. phaseoli*, com aproximadamente 2×10^4 esporos/ml em Tween 20, 0,01%. Após a secagem das gotículas da inoculação, as folhas destacadas foram pulverizadas com as suspensões de bactérias antagonicas com diferentes concentrações.

Nas testemunhas, após a pulverização com suspensão de uredosporos, aplicou-se uma solução de Tween 20, 0,01%.

Após a aplicação dos antagonistas, as placas contendo as folhas inoculadas foram incubadas por 48 horas à temperatura de 16°C, na ausência de luz, e em seguida à 16-20°C sob luz fluorescente contínua.

Estes ensaios foram efetuados com quatro repetições, sendo cada parcela representada por uma folha destacada. A distribuição das repetições na câmara de crescimento foi feita inteiramente ao acaso.

Com cerca de 15 dias de incubação, efetuaram-se as avaliações através da contagem do número de pústulas por parcela. Com base nos resultados obtidos para as testemunhas, calculou-se a porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem.

Após a obtenção dos resultados dos primeiros ensaios de concentração, escolheu-se um isolado de cada grupo, B206, B138 e W401 para se estudar a eficiência dos antagonistas entre diferentes grupos morfológicos, em três concentrações.

A metodologia e a forma de avaliação foram semelhantes àsquelas empregadas nos testes de concentração anteriores.

3.6. Formas de atuação dos antagonistas sobre *U. phaseoli*

Nos ensaios anteriores, a ação antagônica

dos diferentes isolados foi verificada com a aplicação de suspensões de células preparadas a partir de culturas das bactérias em meio sólido NAY.

Com o objetivo de se estudar se os isolados de bactérias antagônicas apresentavam antibiose prepararam-se culturas dos isolados B206, W401 e B138 em meio líquido. Cada isolado de bactéria foi cultivado em BD e em um caldo nutritivo (NYO) com a mesma composição do NAY, exceto em relação ao ágar e ao NaCl que não foram adicionados, por cinco dias, sob agitação constante.

Em seguida efetuou-se a determinação da concentração de bactérias no meio de cultura através da leitura em colorímetro com comprimento de onda ajustado para 625 nm. As culturas de bactérias com as concentrações já determinadas e devidamente homogeneizadas foram divididas ao meio, sendo que metade da cultura de cada isolado foi submetida a uma filtração em filtro Milipore.

Tanto as culturas de antagonistas em meio líquido como seus filtrados foram aplicados sobre folhas destacadas, previamente inoculadas com suspensão de ure-dosporos de *U. phaseoli*, seguindo-se a metodologia utilizada nos ensaios anteriores. As testemunhas foram pulverizadas com os meios de cultura líquidos e seus filtrados após a inoculação com *U. phaseoli*.

Para cada tratamento foram efetuadas quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma folha destacada. O delineamento inteiramente casualizado foi empregado neste ensaio.

A avaliação também foi efetuada como nos ensaios anteriores.

3.7. Efeito da concentração de NaCl adicionado ao meio de cultura sobre a eficiência da bactéria antagonica B206

Para se verificar o efeito da concentração de NaCl adicionado ao meio de cultura líquido sobre a eficiência da bactéria antagonica B206, esta foi cultivada por cinco dias sob agitação constante em meio NY com as seguintes concentrações de NaCl: NY6 - 8 g/l, NY5 - 6 g/l, NY4 - 4 g/l, NY3 - 3 g/l, NY2 - 2 g/l, NY1 - 1 g/l, NY0 - 0 g/l. Além destes meios de cultura, incluiu-se neste ensaio um tratamento em que B206 foi cultivado em BD.

As concentrações das bactérias em meio de cultura foram determinadas em colorímetro, com comprimento de onda ajustado para 625 nm. Após homogeneização, metade da cultura foi submetida à filtração em filtro Milipore.

As testemunhas foram pulverizadas, após a inoculação com *U. phaseoli*, com os meios de cultura contendo diferentes concentrações de NaCl e seus filtrados.

A metodologia empregada durante a instalação e condução deste ensaio foi semelhante à dos demais ensaios.

Foram efetuadas três repetições por tratamento e o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso.

A avaliação foi feita da mesma forma que nos demais ensaios.

Os meios com diferentes concentrações de NaCl utilizados no ensaio foram pulverizados em plantas de feijoeiro cultivadas em casa-de-vegetação para verificar os possíveis efeitos fitotóxicos.

3.8. Termoestabilidade dos metabólitos antagônicos

Para se verificar a termoestabilidade da(s) substância(s) antagônica(s) produzida(s) pelos isolados W401 e B206 instalou-se um ensaio em que foram aplicados sobre folhas destacadas de feijoeiro cultivar Rosinha, previamente inoculadas com *U. phaseoli*, os referidos isolados em meio de cultura líquido, o filtrado destas culturas e as culturas autoclavadas a 1 atm por 20 minutos.

O isolado W401 foi cultivado em BD e o isolado B206 foi cultivado tanto em BD como em NY2 (mesma composição do NAY, exceto em relação ao ágar que não foi adicionado e ao NaCl que foi adicionado na proporção de 2 g por litro). As culturas foram incubadas por cinco dias em condições ambientes, sob agitação constante.

A metodologia empregada para a instalação e condução deste ensaio foi semelhante à dos demais ensaios.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Efetuaram-se três repetições por tratamento.

A avaliação procedeu-se da mesma forma que nos demais ensaios.

3.9. Efeito residual dos isolados de bactérias antagônicas

O poder residual dos isolados de bactérias antagônicas foi estudado em casa-de-vegetação. Um lote de vasos contendo plântulas de feijoeiro cultivar Rosinha, com folhas primárias ainda jovens, foi pulverizado uniformemente com a suspensão dos isolados de bactérias antagônicas e mantido em casa-de-vegetação. A inoculação com *U. phaseoli* foi efetuada logo a seguir em um dos tra-

tamentos e nos demais tratamentos foi efetuada em vários intervalos de tempo a partir da aplicação dos antagonistas. Outro lote de vasos com plântulas no mesmo estágio de desenvolvimento (folhas primárias jovens) não foi pulverizado com a bactéria antagonica, sendo incluídos como testemunhas nos vários intervalos de tempo testados entre a aplicação do antagonista e do patógeno.

Os isolados de bactérias antagonicas testados foram B206, B187, B138 e W401. As culturas desenvolveram-se em NAY e a partir delas preparou-se uma suspensão de bactérias com concentração ajustada para valores de transmitância 5, em colorímetro, com comprimento de onda 625 nm.

As plantas foram inoculadas com *U. phaseoli* à tarde e mantidas em câmara úmida por 12 horas.

Os ensaios foram instalados no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo que cada repetição constituiu-se por um vaso contendo duas ou quatro plântulas, conforme o ensaio. As testemunhas consistiram de um vaso contendo duas ou quatro plântulas, conforme o ensaio, pulverizadas somente com *U. phaseoli*.

Cerca de 10 dias após a inoculação com *U. phaseoli* efetuou-se a contagem do número de pústulas por parcela e com base nos resultados das testemunhas determinou-se a porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem.

3.10. Determinação do poder erradicante dos isolados de bactérias antagonicas sobre *U. phaseoli*

A determinação do poder erradicante dos isolados de bactérias antagonicas sobre *U. phaseoli* foi efetuado pulverizando-se suspensões de bactérias em solu-

ção de Tween 20, 0,01% ou de culturas em meios líquidos sobre pústulas de ferrugem, das quais foram coletados esporos que foram inoculados em folhas destacadas.

Inicialmente, folhas destacadas de feijoeiro foram inoculadas com suspensão de esporos de *U. phaseoli*, com concentração aproximada de 2×10^4 esporos/ml e incubadas por cerca de 15 dias em câmara de crescimento até desenvolvimento das pústulas.

Ao mesmo tempo, as bactérias antagônicas B138, B206 e W401 foram repicadas para NAY, B206 em NYO e W401 em BD e incubadas por cinco dias em condições ambientes, sendo que as culturas líquidas permaneceram sob agitação constante.

A partir das culturas em NAY prepararam-se suspensões de bactérias com concentração padronizada (transmitância = 5) e as concentrações das culturas líquidas foram também determinadas em colorímetro, com comprimento de onda ajustado para 625 nm.

As bactérias antagônicas foram pulverizadas sobre as pústulas de ferrugem que se formaram sobre as folhas destacadas. Após a pulverização, as folhas destacadas foram novamente incubadas por 48 horas em câmara de crescimento, a uma temperatura de 16 a 20°C e luz fluorescente contínua.

As testemunhas foram pulverizadas ou com solução de Tween 20, 0,01% ou com os meios líquidos utilizados no ensaio.

Em seguida foram coletados esporos de cada tratamento a partir dos quais prepararam-se suspensões com concentrações de aproximadamente 2×10^4 esporos/ml em solução de Tween 20, 0,01%. Estas suspensões foram pulverizadas sobre folhas destacadas que em seguida foram incubadas da mesma forma que nos demais ensaios.

O ensaio foi instalado no delineamento in-

teiramente casualizado, com quatro repetições, sendo cada repetição constituída por uma folha destacada. A avaliação foi efetuada da mesma forma do que nos ensaios anteriores.

3.11. Identificação dos microrganismos antagônicos

A identificação dos isolados de bactérias antagônicas foi efetuada através de características morfológicas da cultura em meio sólido e em meio líquido, características morfológicas da célula determinadas em microscopia ótica, características de crescimento (temperatura, pH, % de NaCl, O₂) e características bioquímicas.

Estas características foram determinadas parte nos laboratórios de Fitopatologia da ESALQ/USP/ Piracicaba/SP e parte em análises realizadas pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia "André Tosello" - Campinas/SP.

A identificação foi feita com base na classificação apresentada no *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* (1984).

2.12. Análises estatísticas

Apenas os dados dos testes preliminares de seleção de microrganismos antagônicos não foram submetidos a análises estatísticas.

Os dados de porcentagem obtidos nos ensaios analisados estatisticamente não foram submetidos a transformações.

Os ensaios efetuados para avaliar o efeito da concentração de antagonistas sobre *U. phaseoli*, para avaliar a termoestabilidade da(s) substância(s) com ação antagônica produzida pelas bactérias, para verificar o

efeito erradicante das bactérias antagônicas foram analisados no delineamento inteiramente casualizado com número de tratamentos e de repetições variável de acordo com o ensaio. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e em seguida as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O ensaio instalado com o objetivo de se estudar a forma de atuação das bactérias antagonistas foi analisado estatisticamente como fatorial $2 \times 2 \times 3$ (fator A: filtrados e não filtrados, fator B: meios de cultura BD e NYO e fator C: isolados B206, B138 e W401) com quatro repetições. Efetuou-se uma análise de variância pelo teste F e em seguida, comparações de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados do ensaio de influência da concentração de NaCl sobre a eficiência do isolado B206 na redução do número de pústulas de ferrugem foram analisados como fatorial 2×8 (fator A: filtrado e não filtrado e fator B: diferentes meios de cultura) pelo teste F e teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os ensaios instalados em casa-de-vegetação com o objetivo de se avaliar o poder residual dos isolados de bactérias antagônicas foram analisados através de regressão polinomial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção preliminar de microrganismos antagônicos

Os resultados da primeira fase da seleção preliminar de microrganismos antagônicos estão apresentados nos Apêndices 1 a 14 e os da segunda fase de seleção estão apresentados nos Apêndices 15 a 18. Nem todos os microrganismos testados na primeira fase de seleção tiveram seu antagonismo confirmado na segunda fase.

Os resultados positivos observados na primeira fase de seleção e confirmados na segunda fase estão reunidos na Tabela 1, onde se pode observar a alta eficiência dos 12 isolados de bactérias antagônicas na redução do número de pústulas de ferrugem em folhas de feijoeiro.

Observando-se as características morfológicas das colônias dos 12 isolados de bactérias antagônicas verificou-se a possibilidade de subdividi-los em quatro grupos. Desta forma, os isolados B96, B175, B187 e B206 constituíram o grupo 1 (colônias amarelas); os isolados B106, B132, B138 e B196 constituíram o grupo 2 (colônias vermelhas); o isolado B11 constituiu o grupo 3 (colônia bege) e os isolados W48, W85 e W401, pertencentes ao grupo 4, foram classificados como *B. subtilis* por BETTIOL (1988).

Dentre os 12 isolados de bactérias antagônicas testados, pode-se observar que sete são originários do filoplano do feijoeiro (B), três do filoplano do arroz

Tabela 1 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano do feijoeiro e do solo (B) e dos isolados de *Bacillus subtilis* (W) no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactérias antagônicas	Origem	redução no número de pústulas de ferrugem (%)	
		1ª fase de seleção(1)	2ª fase de seleção(2)
B96	Solo	99,6	91,3
B175	filoplano (feijoeiro)	100,0	96,9
B187	filoplano (feijoeiro)	100,0	97,0
B206	filoplano (feijoeiro)	95,9	98,6
B106	solo	96,4	95,6
B132	filoplano (feijoeiro)	91,4	96,0
B138	filoplano (feijoeiro)	97,4	100,0
B196	filoplano (feijoeiro)	100,0	96,8
B11	filoplano (feijoeiro)	65,8	97,8
W48	filoplano (arroz)	92,4	88,3
W85	filoplano (arroz)	100,0	83,0
W401	filoplano (arroz)	97,4	88,6

(1) média de 2 repetições.

(2) média de 4 repetições.

(W) e dois do solo (B). Estes resultados indicam que a maior parte dos isolados, pertencentes a diferentes espécies de bactérias antagônicas, são habitantes do filoplasma do feijoeiro. Este aspecto assume grande importância para o sucesso do controle biológico por estar relacionado com as maiores chances de sobrevivência e adaptação do antagonista no seu próprio "habitat", como foi ressaltado por GINDRAT (1983).

A eficiência de isolados de *B. subtilis* no controle de diversas doenças já foi relatada por diversos pesquisadores. Vários trabalhos de pesquisa comprovaram a ação antagônica de isolados de *B. subtilis* sobre a ferrugem do feijoeiro causada por *U. phaseoli* (STAVELY et alii, 1981; BAKER et alii, 1983 e BAKER et alii, 1985). PUSEY & WILSON (1984) e FORTES (1986) obtiveram resultados positivos com a aplicação em pós-colheita de *B. subtilis* em pêssegos e nectarinas para controle da podridão parda causada por *Monilinia fructicola*. CUBETA et alii (1985) verificaram a alta eficiência de *B. subtilis* sobre *Phomopsis* sp em soja através do tratamento de sementes. BETTIOL (1988) verificou a ação antagônica de *B. subtilis* sobre *Pyricularia oryzae*, agente causal do brunzimento do arroz. BETTIOL et alii (1989) obtiveram resultados positivos com a aplicação de *B. subtilis* para o controle do mofo cinzento, causado por *Botrytis cinerea*, em morango. ROVERATTI et alii (1989) relataram os bons resultados obtidos no controle da ferrugem do cafeeiro, causada por *Hemileia vastatrix* com a aplicação de bactérias do gênero *Bacillus*, inclusive com a espécie *B. subtilis*.

Tendo em vista as diferentes características morfológicas verificadas nos demais grupos de bactérias antagônicas, pode-se considerar que existem outras espécies, habitantes do solo e do filoplasma, com capaci-

dade de inibir a formação de pústulas de ferrugem do feijoeiro.

A obtenção de isolados pertencentes a diferentes espécies de antagonistas pode ter ocorrido em função do método de seleção empregado, ou seja, a utilização de meios seletivos na forma sólida. Desta forma, pode-se ampliar os estudos sobre o controle biológico da ferrugem do feijoeiro, uma vez que as diferentes espécies de antagonistas, possivelmente possuem características diferentes quanto a forma de atuação, capacidade de sobrevivência e multiplicação sobre o hospedeiro, além de outras a serem consideradas num programa de controle biológico de doenças de plantas.

Dentre os 249 microrganismos testados, sendo a maioria bactérias, foram incluídos também, isolados de fungos e actinomicetos, mas como se pode observar nos Apêndices 13 e 14, a eficiência destes isolados sobre o controle de *U. phaseoli* foi menor em relação aos isolados de bactérias. Além da menor eficiência dos isolados de fungos e actinomicetos, deve-se salientar as maiores dificuldades em se trabalhar com estes microrganismos, uma vez que possuem crescimento mais lento do que as bactérias e nem sempre produzem esporos no meio de cultura escolhido, havendo necessidade de se utilizar micélio maceado. A menor eficiência dos fungos e actinomicetos, aliada a uma maior dificuldade de utilizá-los, implicou na seleção dos isolados de bactérias com ação antagônica, para dar prosseguimento à pesquisa.

Os testes de seleção preliminar foram efetuados em duas fases com o objetivo de se diminuir o volume de testes com os 249 microrganismos inicialmente testados. Desta forma, na primeira fase de seleção, foram efetuadas apenas duas repetições para cada antagonista, podendo portanto, ocorrerem casos de alta porcentagem de

inibição devido a possíveis desuniformidades, principalmente na distribuição do inóculo do patógeno. Como se pode observar, confirmou-se a ação antagônica de apenas 12 dos isolados, dentre os 37 que inicialmente apresentaram antagonismo. Esta diferença nos resultados obtidos na primeira fase poderia estar ligada a diferentes fatores além da possível desuniformidade de distribuição do inóculo já mencionada, como por exemplo, o envolvimento de diferentes grupos de raças nas duas fases de seleção (1ª fase - uredosporos originários de Piracicaba/SP, 2ª fase - uredosporos originários de Catanduva/SP) sobre as quais os antagonistas estariam atuando diferentemente. Além disso, poderia ter ocorrido um decréscimo ou perda de eficiência nas sucessivas repicagens do antagonista até a realização da segunda fase.

Pelo fato do patógeno tratar-se de um parasita obrigatório, houve necessidade de se realizar os testes sobre a planta hospedeira. Um dos aspectos que contribuiu para o sucesso da seleção de antagonistas à *U. phaseoli*, foi a capacidade de sobrevivência da folha do feijoeiro quando acondicionada em condições adequadas de laboratório. Desta forma, a técnica da folha destacada propiciou tanto a sobrevivência das folhas como o desenvolvimento de pústulas de ferrugem, facilitando a seleção de microrganismos principalmente na fase preliminar de seleção, que envolveu grande número de ensaios. A realização destes testes em casa-de-vegetação implicaria em: necessidade de mais espaço, maiores dificuldades de controle das condições ambientes, na uniformização de distribuição do inóculo do patógeno e na pulverização com os antagonistas.

O fato dos testes de seleção terem sido efetuados diretamente sobre a superfície do hospedeiro tem vantagens em relação aos testes efetuados em meios de

cultura, pois estão mais próximos das condições naturais. Outro aspecto importante a ser considerado é que sob condições de luz, temperatura e umidade controladas não houve necessidade de adição de nutrientes para obtenção de antagonistas eficientes, uma vez que todos os isolados selecionados foram aplicados em solução aquosa de Tween 20, 0,01%.

4.2. Efeito da aplicação de antagonistas em diferentes concentrações

Os resultados dos ensaios realizados com o objetivo de avaliar a eficiência das bactérias antagônicas aplicadas em diferentes concentrações sobre a formação de pústulas de ferrugem estão apresentados nos Apêndices 19 a 23.

Os resultados da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade referentes aos Apêndices 19 a 23 estão apresentados nas Tabelas 2 a 6, respectivamente.

Na Tabela 2 observa-se que os isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 1 (colônias amarelas) apresentaram maior eficiência quando aplicados em suspensões concentradas (transmitância 5, 10 e 20), inibindo em média mais de 90% o número de pústulas de ferrugem. O isolado B187, mesmo aplicado em suspensão contendo uma concentração menor de células (transmitância 83) apresentou-se eficiente no controle da ferrugem, não diferindo estatisticamente dos tratamentos em que suspensões concentradas de outros isolados (B96 e B206) foram pulverizadas. Os isolados B96 e B206 aplicados em suspensões diluídas (transmitância 83 a 84 conforme o isolado) apresentaram menor eficiência sobre a redução do número de pústulas de ferrugem, diferindo estatisticamente dos

Tabela 2 - Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 1 (B96, B175, B187 e B206) em diferentes concentrações.

Tratamento		Redução no número de	
Bactéria antagônica	Concentração (transmitância) ⁽³⁾	pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾	
B96	5	99,60 ⁽²⁾	a
B96	10	99,78	a
B96	20	98,25	a
B96	82	64,95	d
<hr/>			
B175	10	99,15	a
B175	20	96,65	ab
B175	84	78,62	c
<hr/>			
B187	10	99,47	a
B187	20	99,62	a
B187	84	85,53	bc
<hr/>			
B206	5	99,85	a
B206	10	98,50	a
B206	20	94,18	ab
B206	83	64,78	d
B206	99	7,45	e

DMS = 11,59

C.V.(%) = 5,40

(1) média de quatro repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) comprimento de onda de 625 nm.

Tabela 3 - Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 2 (B106, B132, B138 e B196) em diferentes concentrações.

Tratamento		Redução no número de	
Bactéria antagônica	Concentração (transmitância) ⁽³⁾	pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾	
B106	5	92,48 ⁽²⁾	a
B106	12	94,38	a
B106	75	19,98	c
B132	5	99,38	a
B132	12	97,52	a
B132	72	42,00	c
B138	12	99,75	a
B138	74	49,38	bc
B196	12	81,12	ab
B196	73	19,98	c

DMS = 35,58

C.V.(%) = 21,21

(1) média de quatro repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) comprimento de onda de 625 nm.

Tabela 4 - Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolado de bactéria antagonista do grupo morfológico 3 (B11) em diferentes concentrações.

Tratamento		Redução no número	
Bactéria	Concentração	de	
antagônica	(transmitância) ⁽³⁾	pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾	
B11	5	79,45 ⁽²⁾	a
B11	10	21,48	b
B11	20	41,75	b
B11	82	9,38	b

DMS = 34,63

C.V.(%) = 43,38

(1) média de quatro repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) comprimento de onda de 625 nm.

Tabela 5 - Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 4 (W48, W85, W401 - já identificados como *Bacillus subtilis*) em diferentes concentrações.

Tratamento		Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾
Bactéria antagônica	Concentração (transmitância) ⁽³⁾	
W48	5	94,88 ⁽²⁾ a
W48	10	92,45 a
W48	73	74,12 b
W85	5	95,28 a
W85	10	91,30 a
W85	73	77,45 b
W401	5	98,05 a
W401	10	92,78 a
W401	75	77,52 b
W401	96	32,88 c
DMS = 13,26		
C.V.(%) = 6,66		

(1) média de quatro repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) comprimento de onda de 625 nm.

Tabela 6 - Comparação de médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem em folhas destacadas de feijoeiro, pulverizadas com isolados de bactérias antagônicas de diferentes grupos morfológicos (B138, B206 e W401) em diferentes concentrações.

Tratamento		Redução no número	
Bactéria antagônica	Concentração (transmitância) ⁽³⁾	de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾	
B138	5	100,00 ⁽²⁾	a
B138	10	99,82	a
B138	70	68,95	c
<hr/>			
B206	5	99,30	a
B206	10	97,20	ab
B206	73	84,08	b
<hr/>			
W401	5	99,65	a
W401	10	99,40	a
W401	73	89,85	ab

DMS = 13,62

C.V.(%) = 6,17

(1) média de quatro repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) comprimento de onda de 625 nm.

tratamentos em que foram aplicadas suspensões concentradas. Houve uma redução acentuada na eficiência da bactéria antagônica B206 aplicada em suspensão bastante diluída (transmitância 99), sendo este tratamento estatisticamente diferente dos demais.

Pode-se observar na Tabela 3 que não foram detectadas diferenças estatísticas significativas, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, entre os tratamentos em que foram aplicadas suspensões concentradas dos isolados de bactérias antagônicas do grupo morfológico 2 (colônias vermelhas), sendo que a redução no número de pústulas de ferrugem atingiu mais de 90%, exceto para o isolado B196 na concentração com transmitância 12. As suspensões diluídas (transmitância 72 a 75 conforme o isolado) apresentaram menor eficiência.

Na Tabela 4 pode-se verificar que quando se aplicou a suspensão de células mais concentrada do isolado de bactéria antagônica B11 (transmitância 5) houve uma redução de 79,45% no número de pústulas de ferrugem, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos em que foram aplicadas suspensões menos concentradas.

Para os isolados de *B. subtilis* (Tabela 5) também se observa um decréscimo de eficiência à medida que se dilui as suspensões de células aplicadas. Todos os isolados de *B. subtilis* testados reduziram em mais de 90% o número de pústulas de ferrugem quando aplicados em suspensões com transmitância 5 e 10. Estes tratamentos foram estatisticamente diferentes daqueles em que foram aplicadas suspensões diluídas (transmitância 73 a 75), entretanto, mesmo nestas menores concentrações, ocorreu uma redução de cerca de 74 a 77% no número de pústulas de ferrugem. A suspensão do isolado W401 na maior diluição testada (transmitância 96) ainda apresentou um decréscimo de 33% no número de pústulas de ferrugem, sendo estatis-

ticamente diferente dos demais tratamentos.

A comparação de um isolado de cada grupo morfológico (exceto do grupo 3), aplicados em diferentes concentrações (Tabela 6) confirmou a alta eficiência de B138, B206 e W401 (*B. subtilis*) sobre a redução do número de pústulas de ferrugem quando aplicados em suspensões concentradas (transmitância 5 e 10). Não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em que foram aplicadas suspensões concentradas, nem entre estes e aquele em que se aplicou o isolado W401 de *B. subtilis* em menor concentração (transmitância 73). Resultados semelhantes foram obtidos por BETTIOL (1988) em seus estudos sobre controle biológico do brusone do arroz, nos quais verificou que alguns isolados de *B. subtilis* inibiram o crescimento micelial do patógeno numa faixa que variou de 59 a 82% quando empregados em baixas concentrações. Entre os tratamentos testados o que apresentou menor eficiência foi o isolado B138 em suspensão diluída (transmitância 70), diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

Embora não se possa comparar as suspensões com base no número de células, uma vez que se determinou a concentração em colorímetro para os diferentes isolados com colorações diferentes (bege, amarela ou vermelha dependendo do grupo morfológico), estes dados são de interesse para se verificar até qual diluição se observa ação antagônica das bactérias testadas, quando submetidas às mesmas condições em um mesmo ensaio.

Os resultados dos estudos sobre o efeito da concentração de células do antagonista sobre a redução de pústulas de ferrugem do feijoeiro, evidenciaram que os isolados de *B. subtilis*, B96, B175, B187 e B206 mesmo aplicados em suspensões com baixa concentração (transmitância de 73 a 84, conforme o isolado) foram eficientes

no controle da ferrugem do feijoeiro sob condições de laboratório, inibindo a formação de pústulas na faixa de 64 a 90%. Talvez a maior eficiência de alguns destes isolados em baixas concentrações possa estar correlacionada a uma maior capacidade de multiplicação sobre a folha do feijoeiro, quando comparado com os demais isolados do mesmo grupo morfológico.

Os isolados do grupo morfológico 2, embora altamente eficientes em suspensões concentradas foram os que apresentaram maior decréscimo de eficiência quando aplicados em baixas concentrações. Vários fatores poderiam estar implicados na obtenção destes resultados, como por exemplo, a menor concentração do número de células nas suspensões diluídas em relação aos isolados dos demais grupos morfológicos, uma vez que se determinou a concentração em colorímetro e à maior dificuldade de sobrevivência e adaptação destes isolados de antagonistas nas condições de laboratório utilizadas para os testes. Entretanto, acredita-se que a principal causa deste decréscimo pode estar correlacionada às características próprias dos isolados deste grupo. Em suspensão aquosa de Tween 20, 0,01%, ocorre a formação de um precipitado de células, em curtos períodos de tempo (cerca de uma hora) que uma vez formado, não entra mais em suspensão, mesmo sob agitação. Desta forma a aplicação destes isolados tornou-se mais difícil e desuniforme principalmente em suspensões diluídas em que apenas alguns aglomerados de células ficam dispersos. Um fator que contribuiu para se acreditar que esta seja a causa mais provável da baixa eficiência destes isolados em suspensões diluídas foi o resultado obtido no ensaio efetuado com isolados de diferentes grupos morfológicos (Tabela 6), ou seja, 68% de inibição na formação de pústulas de ferrugem com a aplicação de Bl38 com transmitância 70, mas com as células

uniformemente distribuídas na suspensão. Evitou-se a formação do precipitado através de constante agitação da suspensão desde seu preparo até sua aplicação.

A atuação em baixas concentrações dos isolados de antagonistas é muito interessante, implicando em economia no processo de preparo das culturas a serem pulverizadas. Este aspecto, somando a outras características importantes que deve possuir um antagonista pode conduzir à seleção de antagonistas eficientes no controle da doença em condições de campo.

A partir do último ensaio de concentração excluiu-se o isolado de bactéria antagônica B11 por ter apresentado uma menor eficiência em relação aos outros isolados, mesmo quando aplicado em suspensões concentradas. A alta eficiência do isolado B11 observada na segunda fase dos testes preliminares de seleção poderia ser atribuída à utilização de uma suspensão mais concentrada do que as utilizadas nestes ensaios de concentração.

4.3. Formas de atuação dos antagonistas sobre *U. phaseoli*

Os resultados do ensaio instalado para se verificar a forma de atuação dos isolados de bactérias antagônicas B206, B138 e W401 estão apresentados no Apêndice 24. Na análise de variância pelo teste F observaram-se diferenças estatísticas significativas em todos os fatores analisados (fator A: filtrados e não filtrados, fator B: meios de cultura BD e NYO, fator C: isolados B206, B138 e W401) e para todas as interações dos fatores estudadas (A x B, A x C, B x C e A x B x C). Nas Tabelas 7 a 11 estão apresentados os resultados de comparação de médias de alguns desdobramentos dos graus de liberdade

Analizando as Tabelas 7 a 11, pode-se ob-

Tabela 7 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas e de filtrados de culturas de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em BD e NYO.

Bactéria antagônica	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾
W401	97,12 ⁽²⁾ a
B206	55,14 b
B138	18,55 c

DMS = 5,36	
C.V. (%) = 10,93	

(1) cálculo da média apresentada para cada isolado = cultura em BD + cultura em NYO + filtrado em BD + filtrado em NYO/16.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 8 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas dos isolados de bactérias antagonicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em BD e NY0.

Bactéria antagônica	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾
W401	99,08 ⁽²⁾ a
B206	55,89 b
B138	33,41 c

DMS = 7,58

C.V. (%) = 10,93

(1) cálculo da média apresentada para cada isolado = cultura em BD + cultura em NY0/8.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 9 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização dos filtrados das culturas dos isolados de bactérias antagonicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em BD e NYO.

Bactéria antagônica	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾
W401	95,16 ⁽²⁾ a
B206	54,40 b
B138	3,69 c

DMS = 7,58

C.V. (%) = 10,93

(1) cálculo da média apresentada para cada isolado = filtrado em BD + filtrado em NYO/8.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 10 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas e de filtrados das culturas de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em BD.

Bactéria antagônica	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾
W401	99,74 ⁽²⁾ a
B206	51,50 b
B138	2,56 c

DMS = 7,58	
C.V. = 10,93	

(1) cálculo da média apresentada para cada isolado = cultura em BD + filtrado em BD/8.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 11 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas e de filtrados das culturas de bactérias antagônicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138 em NYO.

Bactéria antagônica	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾
W401	94,50 ⁽²⁾ a
B206	58,79 b
B138	34,54 c

DMS = 7,58	
C.V. (%) = 10,93	

(1) cálculo da média apresentada para cada isolado = cultura em NYO + filtrado em NYO/8.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

servar que o isolado W401 de *B. subtilis* apresentou-se mais eficiente tanto quando aplicaram-se as culturas nos meios BD e NYO como quando foram aplicados apenas os filtrados das culturas, diferindo estatisticamente dos demais isolados testados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todas as formas de aplicação da bactéria antagonica W401 estudadas proporcionaram uma redução superior a 90% no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, e portanto, pode-se considerar que ocorre a liberação de alguma substância tóxica à *V. phaseoli* para o meio de cultura. *B. subtilis* é uma espécie produtora de vários antibióticos como relatado por BERDY (1974), BUCHANAN & GIBBONS (1979), KATZ & DEMAINS (1977) e NORRIS et alii (1981). Esta forma de atuação denominada antibiose (Jackson, citado por PARK, 1960) também foi observada em isolados de *B. subtilis* nos trabalhos de BAKER et alii (1983) sobre o controle biológico da ferrugem do feijoeiro e de BETTIOL (1988) sobre o controle biológico do brusone do arroz. Esta forma de atuação permite que se utilize diretamente o(s) metabólito(s) com ação antagônica produzido(s) pela bactéria.

O isolado de bactéria antagonica B206 (Tabelas 7 a 11) apresentou menor eficiência do que o isolado W401, diferindo estatisticamente dos demais isolados estudados, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade em todas as interações dos fatores analisadas. Embora a bactéria antagonica B206 tenha se desenvolvido bem em ambos meios de cultura utilizados (conforme valores de transmissância indicados no Apêndice 24), não apresentou resultado satisfatório quanto à redução no número de pústulas de ferrugem, quando cultivada e aplicada em BD. Em meio NYO, ocorre bom desenvolvimento da bactéria e a alta redução no número de pústulas de ferrugem é comparável à proporcionada pelo isolado de *B. subtilis*, W401. A eficiência

da cultura de B206 em NYO (99,6%) comparável a de W401 pode ser visualizada no Apêndice 24, uma vez que no desdobramento apresentado na Tabela 8, o valor de redução no número de pústulas de ferrugem de B206, 55,89%, representa a média dos resultados obtidos quando B206 foi cultivado em BD e em NYO. Em relação aos filtrados, observou-se uma redução da ordem de 90% no número de pústulas de ferrugem com a aplicação do filtrado da cultura em BD.

O isolado B138 (Tabelas 7 a 11) não reduziu tão eficientemente o número de pústulas de ferrugem, diferindo estatisticamente dos isolados B206 e W401, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. O desenvolvimento do isolado B138 em meio BD foi menor em relação ao meio NYO, mas mesmo neste último, a bactéria antagônica apresenta-se menos eficiente do que as demais. Neste caso, não se observou a ocorrência de antibiose, uma vez que nenhum dos filtrados testados reduziu o número de pústulas de ferrugem.

Como se pode verificar, de maneira geral, os isolados de bactérias antagônicas testados, também são capazes de reduzir o número de pústulas de ferrugem quando cultivados em meios de cultura líquidos. Apenas o isolado B138 apresentou menor eficiência do que aquela que estava sendo observada nos testes de seleção preliminar e nos ensaios de concentração em que se utilizavam suspensões preparadas a partir de culturas em meio sólido. Quando B138 foi cultivado e aplicado em meio líquido, não se observou a formação de precipitados e aglomerados de células como ocorreu nos ensaios em que se utilizou suspensões de células em solução aquosa de Tween 20, 0,01%.

4.4. Efeito da concentração de NaCl adicionado ao meio sobre a eficiência da bactéria antagônica B206

Em testes preliminares efetuados para se estudar a forma de atuação do isolado B206, este foi cultivado em caldo nutritivo NY com a composição original apresentada no item 3.1 (exceto em relação ao ágar), contendo 8 g de NaCl por litro de meio de cultura. Os resultados destes testes não estão apresentados no presente trabalho, pois observou-se sintomas de fitotoxicidade tanto em folhas destacadas como em plantas cultivadas em casa-de-vegetação que receberam pulverizações com o referido meio de cultura. Como os sintomas restringiam-se a queima dos bordos das folhas, foi possível avaliar a eficiência do isolado B206 e verificou-se que ocorria uma redução de cerca de 90% no número de pústulas de ferrugem quando se pulverizava tanto a cultura em meio líquido como o filtrado desta cultura. Entretanto, os dados do ensaio apresentados no item 4.3., em que se utilizou o meio NYO (ausência de NaCl), evidenciaram um efeito satisfatório da cultura líquida de B206, porém o filtrado desta cultura não reduziu eficientemente o número de pústulas de ferrugem.

Com base nestes resultados levantou-se a hipótese de que a concentração do NaCl poderia ter influência na produção de alguma substância com ação antagônica sobre *U. phaseoli*. Os resultados do ensaio instalado para testar tal hipótese estão apresentados no Apêndice 25. As comparações de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade estão apresentadas nas Tabelas 12 a 14.

A Tabela 12 evidencia a maior eficiência do isolado B206 aplicado em cultura líquida, em relação a aplicação dos filtrados das culturas, podendo-se observar diferenças estatísticas significativas entre as duas fór-

Tabela 12 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas do isolado B206 em NY com diferentes concentrações de NaCl e seus filtrados.

Tratamento	Redução no número de pústulas de ferrugem (%)
meios de cultura nao filtrados	87,21 ⁽¹⁾ a
meios de cultura filtrados	63,84 b

DMS = 7,55

C.V. (%) = 17,06

(1) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 13 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização das culturas do isolado B206 em NY com diferentes concentrações de NaCl.

Tratamento (3)	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) (1)	sintomas de fitotoxicidade
B206-NY6	97,60 ⁽²⁾ a	+
B206-NY5	98,47 a	+
B206-NY4	100,00 a	+
B206-NY3	98,27 a	+
B206-NY2	98,67 a	-
B206-NY1	89,67 a	-
B206-NY0	89,03 a	-
B206-BD	25,97 b	-

DMS = 33,87

C.V. (%) = 17,06

(1) média de três repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) NY6 - 8 g de NaCl/l de NY0, NY5 - 6 g de NaCl/l de NY0, NY4 - 4 g de NaCl/l de NY0, NY3 - 3 g de NaCl/l de NY0, NY2 - 2 g de NaCl/l de NY0, NY1 - 1 g de NaCl/l de NY0, NY0 - ausência de NaCl no meio de cultura.

Tabela 14 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização dos filtrados das culturas do isolado B206 em NY com diferentes concentrações de NaCl.

Tratamento ⁽³⁾	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾
B206-NY6 (F)	72,53 ⁽²⁾ a
B206-NY5 (F)	77,13 a
B206-NY4 (F)	71,73 a
B206-NY3 (F)	81,33 a
B206-NY2 (F)	64,00 ab
B206-NY1 (F)	50,37 ab
B206-NY0 (F)	30,40 b
B206-BD (F)	63,27 ab

DMS = 33,87

C.V. (%) = 17,06

(1) média de três repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) NY6 - 8 g de NaCl/l de NY0, NY5 - 6 g de NaCl/l de NY0, NY4 - 4 g de NaCl/l de NY0, NY3 - 3 g de NaCl/l de NY0, NY2 - 2 g de NaCl/l de NY0, NY1 - 1 g de NaCl/l de NY0, NY0 - ausência de NaCl no meio de cultura.

mas de aplicação, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Em todos os tratamentos em que se aplicou a cultura líquida de B206 em NY com as diferentes concentrações de NaCl testadas (Tabela 13), observou-se reduções de 90 a 100% no número de pústulas de ferrugem, sendo que não foram detectadas diferenças estatísticas significativas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade entre esses tratamentos. Observou-se sintomas de fitotoxicidade nas folhas destacadas e em plantas cultivadas em casa-de-vegetação, quando se aplicaram as culturas nos meios NY3, NY4, NY5 e NY6. Culturas de B206 em NY2 reduziram em cerca de 98% o número de pústulas de ferrugem sem provocar sintomas de fitotoxicidade no feijoeiro. A eficiência da cultura de B206 em BD foi menor e diferiu estatisticamente dos demais tratamentos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Com a aplicação dos filtrados das culturas de B206 em NY com as diferentes concentrações de NaCl (Tabela 14), obtiveram-se resultados que confirmam aqueles observados nos ensaios anteriores. O filtrado da cultura B206 em NY0 (ausência de NaCl) reduziu em menor porcentagem o número de pústulas de ferrugem, quando comparado com os filtrados da cultura B206 em NY contendo NaCl, diferindo estatisticamente dos tratamentos em que se aplicou o filtrado de B206 em NY3, NY4, NY5 e NY6 (maiores concentrações de NaCl). Os filtrados das culturas de B206 em NY1 e NY2 reduziram em 50% e 64%, respectivamente, o número de pústulas de ferrugem, não diferindo estatisticamente dos filtrados de B206 em NY3, NY4, NY5 e NY6. O filtrado de B206 em BD, como no ensaio apresentado no item 4.3., apresentou uma redução no número de pústulas superior à cultura de B206 em BD.

Os resultados evidenciaram que a presença

de NaCl no meio de cultura NY é importante para a formação de metabólito(s) tóxico(s) à *U. phaseoli*, produzido(s) pelo isolado B206. Na ausência de NaCl, a eficiência do filtrado de B206 em NY0 foi bastante reduzida. Além da presença, observa-se uma tendência de aumento de eficiência do filtrado de B206 na redução do número de pústulas em maiores concentrações de NaCl no meio de cultura. Em relação a aplicação das culturas de B206 em NY com diferentes concentrações de NaCl, houve alta eficiência (89,03 a 100%) na redução do número de pústulas de ferrugem, sugerindo que somado à antibiose, deve existir um outro mecanismo de atuação envolvido.

4.5. Termoestabilidade dos metabólitos antagônicos

Os dados do ensaio efetuado para se verificar a termoestabilidade dos metabólitos antagônicos produzidos pelo isolado W401 (*B. subtilis*) cultivado em BD e pelo isolado B206 cultivado em BD e NY2 estão apresentados no Apêndice 26. Os resultados da comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade estão apresentados na Tabela 15, onde se pode observar que não foram detectadas diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos em que se pulverizou a cultura do isolado W401 de *B. subtilis*, sob as três formas testadas, ou seja, não autoclavada, filtrada e autoclavada. Em todas as formas de aplicação testadas verificou-se uma eficiência de cerca de 100%, comprovando que a substância com ação antagônica sobre a ferrugem do feijoeiro liberada para o meio de cultura é termoestável. A termoestabilidade da substância antagônica produzida por *B. subtilis* já foi relatada por LANDY et alii (1948), DUNLEAVY (1955), BAKER et alii (1983), PUSEY & WILSON (1984), BAKER et alii (1985), MEDINA (1986) e BETTIOL (1988). A termoestabili-

Tabela 15 - Comparação de médias de porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a pulverização de culturas dos isolados de bactérias antagonistas W401 (*Bacillus subtilis*) e B206 nas formas não autoclavada, autoclavada e filtrada.

Bactéria antagônica	Tratamento		concentração (3) (transmitância)	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) (1)
	meio de cultura	forma de aplicação		
W401	BD	não-autoclavado	52	100,00 ⁽²⁾ a
W401	BD	autoclavado	(52)	98,17 a
W401	BD	filtrado	(52)	98,97 a
B206	NY2	não-autoclavado	20	98,73 a
B206	NY2	autoclavado	(20)	79,27 ab
B206	NY2	filtrado	(20)	62,33 b
B206	BD	não-autoclavado	13	74,90 ab
B206	BD	autoclavado	(13)	67,10 b
B206	BD	filtrado	(13)	20,50 c

DMS = 29,10

C.V. (%) = 13,06

(1) média de três repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) comprimento de onda de 625 nm.

dade é uma importante característica do(s) metabólito(s) tóxico(s), pois pode facilitar a industrialização.

A cultura do isolado B206 em NY2 foi tão eficiente quanto a do isolado W401 sob as três formas de aplicação, não diferindo estatisticamente também dos tratamentos em que se aplicou B206 em NY2 autoclavado e B206 em BD não autoclavado. A aplicação do filtrado da cultura do isolado B206 em NY2 proporcionou uma redução de cerca de 62% no número de pústulas de ferrugem, diferindo estatisticamente do tratamento em que se aplicou a cultura de B206 em NY2. Esse acréscimo de eficiência observado com a aplicação do microrganismo vivo sugere a existência de algum outro mecanismo envolvido além da antibiose. Os resultados também evidenciaram a termoestabilidade da substância antagônica liberada no meio de cultura NY2 pelo isolado B206.

Com relação à cultura de B206 em BD, observou-se que tanto a cultura não autoclavada como a autoclavada não diferiram estatisticamente entre si e diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, do tratamento em que se aplicou o filtrado da cultura. Estes resultados não confirmam aqueles obtidos nos ensaios anteriores em relação ao isolado B206 cultivado em BD, sugerindo a necessidade de se repetir o teste para esclarecer este ponto duvidoso.

4.6. Efeito residual dos isolados de bactérias antagônicas

Os resultados dos estudos sobre a persistência da ação dos isolados de bactérias antagônicas apresentados nos Apêndices 27 a 30 foram submetidos a uma análise de variância pelo teste F, e nos casos em que foram verificadas diferenças estatísticas significativas

entre os tratamentos, efetuou-se a regressão polinomial.

Na Figura 1, pode-se observar o gráfico da equação que melhor representa os dados obtidos com a inoculação de esporos de *U. phaseoli* em diferentes intervalos de tempo a partir da pulverização do isolado de bactéria antagônica B187. Quando a aplicação de B187 é efetuada no mesmo dia que a inoculação de *U. phaseoli*, observa-se uma eficiência de cerca de 100%. Entretanto, a medida em que a inoculação com *U. phaseoli* se distancia da pulverização com a bactéria antagônica ocorre um decréscimo de eficiência, tendendo a se estabilizar em cerca de 30% de redução no número de pústulas de ferrugem no sétimo dia (168 horas) a partir da aplicação do antagonista.

A representação gráfica da equação que melhor representa os dados obtidos no teste efetuado para avaliar o efeito residual do isolado de bactéria antagônica B206 (mesmo grupo morfológico do isolado B187) está apresentada na Figura 2. Nessa Figura pode-se observar que a eficiência de B206, como no caso do isolado B187, se aproxima de 100% quando a pulverização com o antagonista e a inoculação com *U. phaseoli* são efetuadas no mesmo dia. Até o segundo dia após a pulverização com o antagonista observa-se um decréscimo de eficiência. Em seguida pode-se verificar um aumento na eficiência quando a inoculação com *U. phaseoli* é efetuada 72 horas após a aplicação do antagonista.

Nas análises de variância pelo teste F efetuadas para os dados dos Apêndices 29 e 30, referentes ao efeito residual dos isolados W401 (*B. subtilis*) e B138, não se observaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos. As médias dos dados obtidos nestes testes estão apresentadas na Tabela 16. Estes resultados são de grande interesse do ponto de vista biológico, uma

Figura 1 - Efeito residual do isolado da bactéria antagonista B187.

Figura 2 - Efeito residual do isolado da bactéria antagonística B206.

Tabela 16 - Médias da porcentagem de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas com a inoculação de *Uromyces phaseoli* em diferentes intervalos de tempo após a pulverização com as bactérias antagonicas W401 (*Bacillus subtilis*) e B138.

Tratamento (nº de horas a partir da aplicação do antagonista)	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) ⁽¹⁾	
	W401	B138
0	98,7	86,5
24	-	87,3
48	98,9	87,2
72	-	-
96	67,2	88,2
120	79,5	-

(1) média de quatro repetições.

vez que evidenciaram que a eficiência dos antagonistas manteve-se alta, ou seja, em torno de 70-80% até 120 horas após a aplicação de W401 e 80-90% até 96 horas após a aplicação de B138.

Comparando-se os dados de eficiência dos quatro isolados de bactérias antagonicas testados, pode-se verificar que o efeito residual apresentou uma tendência de se manter mais alto para os isolados B138 e W401 (*B. subtilis*) em relação ao dos isolados B206 e B187.

Resultados semelhantes foram obtidos por BAKER et alii (1983) com a aplicação de *B. subtilis* 120 horas antes da inoculação com *U. phaseoli*, em que observaram uma redução de 95% no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro.

O efeito residual observado para os isolados B206, B138 e W401 (*B. subtilis*) é um indicativo importante para se estabelecer os intervalos de tempo de aplicação dos isolados em ensaios de campo.

Partindo-se da hipótese que o comportamento dos isolados de antagonistas seria o mesmo que o observado em casa-de-vegetação, um dos aspectos de importância prática que se pode considerar comparando-se os três isolados estudados é que B206 teria que ser aplicado com maior freqüência que W401 e B138.

4.7. Poder erradicante dos isolados de bactérias antagonicas

Os dados dos estudos sobre o poder erradicante dos isolados de bactérias antagonicas selecionados estão apresentados no Apêndice 31. Os resultados das comparações de médias, efetuadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, estão apresentados na Tabela 17. Nesta tabela pode-se observar que nenhum dos isolados

Tabela 17 - Comparação de médias das porcentagens de redução no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro, obtidas no teste efetuado para se verificar o efeito erradicante dos isolados de bactérias antagonicas W401 (*Bacillus subtilis*), B206 e B138.

Tratamento	concentração (transmitância) (3)	Redução no número de pústulas de ferrugem (%) (1)
B206 + solução de Tween 20	5	68,77 ⁽²⁾ a
W401 + solução de Tween 20	5	61,20 a
B138 + solução de Tween 20	5	24,92 b
B206 em NYO	41	22,98 b
W401 em BD	33	11,62 b

DMS = 26,94

C.V.(%) = 32,54

(1) média de quatro repetições.

(2) médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

(3) comprimento de onda de 625 nm.

testados apresentou eficiência marcante em relação a erradicação da fonte de inóculo do patógeno. Entretanto, verifica-se que dentre os tratamentos testados, a aplicação da suspensão de células de B206 e W401 (*B. subtilis*) em solução de Tween 20, 0,01% reduziu de forma mais eficiente a viabilidade dos esporos de ferrugem. Estes mesmos isolados de bactérias antagônicas aplicados em culturas líquidas apresentaram uma eficiência menor, diferindo estatisticamente dos tratamentos em que se empregaram os isolados B206 e W401 em solução de Tween 20. Talvez esse resultado possa ser explicado pelas diferenças de concentração dos isolados em solução de Tween 20 e em cultura líquida (Apêndice 31).

O isolado B138 em solução de Tween 20 apresentou uma eficiência de cerca de 25% na redução da viabilidade de esporos de *U. phaseoli*, não diferindo estatisticamente dos tratamentos B206 em NYO e W401 em BD, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.8. Identificação dos isolados de bactérias antagônicas

Os resultados obtidos nas análises para determinação das características morfológicas, culturais, bioquímicas e de crescimento dos isolados de bactérias antagônicas estão apresentados nas Tabelas 18 e 19.

Com base nas características determinadas e seguindo-se a classificação apresentada no *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY* (1984), concluiu-se que o isolado B206 pertence ao gênero *Bacillus* e que o isolado B138 estaria relacionado ao gênero *Arthrobacter*. O isolado W401 já havia sido classificado como *Bacillus subtilis* por BETTIOL (1988).

Tabela 18 - Características culturais, morfológicas, bioquímicas e de crescimento utilizadas na identificação do isolado B138 selecionado pela capacidade de inibir a formação de pústulas de *U. phaseoli* em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

I - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS

- 1.1. colônia em agar nutriente (pH = 7,0, temperatura de incubação = 30°C, tempo de incubação = 72 h)
 - a) tamanho: menor que 1 mm
 - b) forma: circular
 - c) superfície: lisa
 - d) bordo: perfeito
 - e) elevação: ligeiramente elevada
 - f) transparência: translúcida
 - g) pigmentação: vermelha
- 1.2. cultura em caldo nutritivo (pH = 7,0, temperatura de incubação = 30°C, tempo de incubação = 24-48 h)
 - a) crescimento superficial: anel ou película ausentes
 - b) turbidez: moderada
 - c) depósito: fraco

II - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DETERMINADAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA

- a) forma da célula: bastonetes e bastonetes-cocóides, em pares, lados dilatados, formando V principalmente em culturas velhas
- b) motilidade: negativa
- c) coloração de Gram: variável
- d) presença de esporos: negativa

III - CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO

- a) requerimento do oxigênio: aerófilo
- b) crescimento a 7% de NaCl: pouco crescimento

IV - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

- a) enzimas respiratórias: catalase e benzidina positivas
 - b) metabolismo de carboidratos: não produz ácido a partir de glicose e lactose, não utiliza citrato
 - c) produção de acetoina a partir de glicose: negativa
 - d) produção de indol: negativa
 - e) redução de nitrato a nitrito: negativa
 - f) produção de H₂S: negativa
 - g) produção de amilase: negativa
 - h) hidrólise da caseína: negativa
-

Tabela 19 - Características culturais, morfológicas, de crescimento, bioquímicas e de resistência térmica utilizadas na identificação do isolado B206 selecionado por sua capacidade em inibir a formação de pústulas de *U. phaseoli* em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

I - CARACTERÍSTICAS CULTURAIS

- 1.1. colônia em agar nutriente (pH = 7,0, temperatura de incubação = 30°C, tempo de incubação = 24 h)
 - a) tamanho da colônia: menor que 1 mm
 - b) forma: circular
 - c) superfície: lisa
 - d) borda: perfeita
 - e) elevação: ligeiramente elevada
 - f) transparência: translúcida
 - g) pigmentação: amarelada
 - h) cultura com mais de 72 h apresenta espalhamento da colônia
- 1.2. cultura em caldo nutritivo (pH = 7,0, temperatura de incubação = 30°C, tempo de incubação = 24 h)
 - a) crescimento superficial: anel ou película ausentes
 - b) turbidez: densa e uniforme
 - c) depósito: abundante

II - CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DETERMINADAS ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ÓTICA

- a) forma da célula: bastonetes finos isolados, extremidades arredondadas, lados paralelos, monomórfico
 - b) motilidade: positiva
 - c) coloração de Gram: positiva
- Obs: em culturas incubadas mais de uma semana a bactéria permaneceu Gram positiva e em uma das extremidades de algumas células observou-se dilatação, podendo ser indicação de esporo terminal

III - CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO

- a) requerimento de oxigênio: aerófilo
- b) crescimento a 7% de NaCl: abundante

IV - CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

- a) enzimas respiratórias: catalase e benzidina positivas
- b) metabolismo de carboidratos: não produz ácido a partir de glicose e lactose, utiliza citrato
- c) produção de acetoina a partir de glicose: negativa
- d) produção de indol: negativa
- e) redução de nitrato a nitrito: positiva
- f) produção de H₂S: produz pouco H₂S no TSI
- g) produção de amilase: negativa
- h) hidrólise de caseína: negativa

V - TESTE PARA DETERMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA TÉRMICA: crescimento positivo após tratamento térmico por 5 minutos a 80°C.

4.9. Considerações finais

O isolado de *B. subtilis* (W401) apresentou características importantes no controle biológico da ferrugem do feijoeiro em condições de laboratório e casa-de-vegetação. Além de sua alta eficiência no controle de *U. phaseoli* mesmo aplicado em suspensões diluídas, atua através de substâncias termoestáveis e possui um efeito residual de pelo menos cinco dias. Estas características aliadas a outras como o rápido desenvolvimento em meio de cultura e na natureza, produção de endosporos e adaptação em várias condições ambientes (BUCHANAN & GIBBONS, 1975; KATZ & DEMAIN, 1977 e ANDREWS, 1985) podem viabilizar o emprego do controle biológico da ferrugem do feijoeiro em condições de campo.

A antibiose foi a forma de atuação determinada para o isolado de *B. subtilis* (W401) quando cultivado em meio de cultura líquido. Entretanto, sua eficiência também foi verificada quando aplicado em suspensão aquosa de Tween 20, 0,01% em condições de laboratório e de casa-de-vegetação. Estes resultados sugerem a possibilidade de *B. subtilis* produzir metabólito(s) tóxico(s) à *U. phaseoli* sobre a superfície do hospedeiro.

Sem dúvida, a antibiose é uma importante forma de atuação dos antagonistas, entretanto, uma evidência de que igual atenção dos pesquisadores deva ser voltada a outras formas de atuação é a alta eficiência de *Arthrobacter* sp no controle de *U. phaseoli* aliada ao seu efeito residual de pelo menos 96 horas em condições de casa-de-vegetação. Os resultados obtidos indicaram que, da mesma forma que *B. subtilis*, *Arthrobacter* sp, pode ser empregado com sucesso no controle biológico da ferrugem do feijoeiro.

Apesar da alta eficiência de *Bacillus* sp no

controle de *U. phaseoli*, faltam estudos básicos relacionados à sua sobrevivência e adaptação, uma vez que em casa-de-vegetação observa-se um baixo efeito residual.

Um dos aspectos que pode contribuir para viabilizar o emprego de antagonistas no controle da ferrugem do feijoeiro, é o curto período em que a cultura deve ser protegida, uma vez que os maiores prejuízos da ferrugem ocorrem até o florescimento (ZAMBOLIM et alii, 1982).

Os resultados obtidos no presente trabalho são promissores, entretanto para viabilizar o emprego de tais antagonistas, existe necessidade de realização de uma série de estudos, relacionados com eficiência em condições de campo, compatibilidade com os demais defensivos agrícolas recomendados para a cultura do feijoeiro, industrialização e conservação.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- Existem microrganismos habitantes do filoplano e do solo capazes de inibir a formação de pústulas de ferrugem do feijoeiro. Dentre eles, destacaram-se os isolados de bactérias antagônicas B138 (*Arthrobacter* sp), B206 (*Bacillus* sp) e W401 (*Bacillus subtilis*).
- Os isolados de fungos e actinomicetos originários do filoplano do feijoeiro e do solo apresentaram menor eficiência na redução do número de pústulas de ferrugem do feijoeiro quando comparados com os isolados de bactérias antagônicas selecionadas.
- *B. subtilis*, *Bacillus* sp e *Arthrobacter* sp apresentaram-se eficientes quando aplicados em suspensões concentradas de células em solução aquosa de Tween 20, 0,01%. Suspensões com baixas concentrações de células, ainda proporcionaram reduções satisfatórias no número de pústulas de ferrugem do feijoeiro.
- A aplicação de *B. subtilis* e *Bacillus* sp em cultura líquida reduziu o número de pústulas de ferrugem do feijoeiro.
- O isolado de *B. subtilis* libera para os meios de cultu-

ra BD e NYO substâncias termoeestáveis com ação antagônica sobre *U. phaseoli*.

- O isolado de *Bacillus* sp atua através de substâncias termoeestáveis liberadas para os meios de cultura, mas a maior eficiência foi observada com a aplicação de células viáveis do antagonista sobre a planta.

- A produção de substâncias antagônicas por *Bacillus* sp é influenciada pela concentração de NaCl presente no meio de cultura NY.

- O isolado de *Arthrobacter* sp não libera substâncias com ação antagônica sobre *U. phaseoli* nos meios de cultura testados.

- *B. subtilis* e *Bacillus* sp em suspensão concentrada de células afetam parcialmente a viabilidade dos esporos de *U. phaseoli*, quando aplicados sobre as pústulas de ferrugem do feijoeiro.

- Os isolados de *B. subtilis* e de *Arthrobacter* sp apresentaram efeito residual maior do que o isolado de *Bacillus* sp em condições de casa-de-vegetação.

- a cultura da folha destacada, utilizada durante a maior parte dos testes efetuados, facilitou a seleção de microrganismos antagônicos, permitindo uniformização nas pulverizações do antagonista e nas inoculações do patógeno, controle eficiente das condições ambientes durante o período de incubação e economia de espaço.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. Plant pathology. 3. ed. San Diego, Academic Press, 1988. 803p.

ALLEN, D.J. *Verticillium lecanii* on the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus*. Trans. Br. Mycol. Soc., 79 (2):362-4, 1982.

ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C. E. & LINDOW, S.E. (coord.) Biological control on the phylloplane. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1985. p.31-44.

BAKER, R. Mechanisms of biological control of soilborne pathogens. Ann. Rev. Phytopathol., 6:263-94, 1968.

BAKER, K.F. & COOK, R.J. Biological control of plant pathogens. San Francisco, W.H. Freeman, 1974. 433 p.

BAKER, C.J.; STAVELY, J.P.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MACFALL, J.S. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology, St. Paul, 73(8): 1148-52, 1983.

BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions.

- Plant Disease, St. Paul, 69(9):770-2, 1985.
- BAUER, L.I. Desarrollo de resistencia de *Uromyces phaseo- typica* a dos fungicidas. Fitopatologia, Lima, 132, 1978.
- BECKER, O.J. & COOK, R.J. *Pythium* control by siderophore producing bacteria on roots of wheat. Phytopathology, St. Paul, 74:806, 1984. (Abstract)
- BERDY, J. Recent development of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. Advanced Applied Microbiology, Madison, 18:309-406, 1974.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a *Pyricularia oryzae* Cav. para o controle da brusone do arroz (*Oryza sativa* L.). Piracicaba, 1988. 140p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz/USP)
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MOSCA, J.L.; VITTI, A.J. Efeito de *Bacillus subtilis* no controle do mofo cinzento (*Botrytis cinerea*) do morango. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. Anais. Departamento de Genética ESALQ-FEALQ/USP e CNPDA/EMBRAPA, 1989. p.85.
- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review Phytopathology, Palo Alto, 20:167-92, 1982.
- BOOSALIS, M.G. & MANKAU, R. Parasitism and predation of microorganisms. In: BAKER, K.F. et alii (coord.) Eco-

- logy of Soilborne Plant Pathogens. Univ. Calif. Press, Berkeley, 1965. p.374-84.
- BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; WATERWORTH, Y. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. Austral. J. Biol. Sci., 24:925-44, 1971.
- BROWDER, L.E. A modified detached-leaf culture technique for study of cereal rust. Plant Disease Reporter, Beltsville, 48:906-8, 1964.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.G. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1975. 1268p.
- CARRIJO, I.V.; CHAVES, G.M.; SEDIYAMA, C.S. Análise da resistência de vinte e cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. a *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. Fitopatologia Brasileira, 4:265-79, 1979.
- COOK, R.J. Management of the associated microbiota. In: HORSFALL, J.G. & COWLING, E.B. (coord.) Plant disease: an advanced treatise. Academic Press, New York, 1977. p.145-66.
- COOK, R.J. Biological control of plant pathogens: theory to application. Phytopathology, St. Paul, 75: 25-9, 1985.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, The American Phytopathological Society, 1983. 539p.

COSTA, A.S. & MÜLLER, G.W. Tristeza control by cross protections: AUS - Brazil cooperative sucess. Plant Disease, St. Paul, 64:538-41, 1980.

CUBETA, M.A.; HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B. Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. Plant Disease, St. Paul, 69: 506-9, 1985.

DUNLEAVY, J. Control of damping-off of sugar beet by *Bacillus subtilis*. Phytopathology, St. Paul, 45:252-8, 1955.

EMBRAPA. Programa Nacional de Pesquisa de Feijão. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1981. 117 p.

FORTES, J.F. Controle biológico da podridão parda, *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey em flores de pessegueiro. Fitopatologia Brasileira, 11:359, 1986. (Resumo)

GINDRAT, D. Possibilites et limites de l'utilisation des antagonistes dans la lutte biologique. In: DUBOS, B. (coord.) Les antagonismes microbiens: modes d'action et application à la lute biologique contra les maladies des plantes; 24^e Colloque de la Societé Française de Phytopathologie. Bordeaux, 1983. p.333-41.

GONZALES AVILA, M. & CASTELLANOS, J.J. Presencia del micoparásito *Darluca filum* sobre uredosporos de *Uromyces phaseoli* var. *typica*. Ciencias de la Agricultura, 3:120-5, 1978.

HENESSY, C.M.R. & SACKSTON, W.E. Studies on sunflower

- rust. V. Culture of *Puccinia helianthi* throughout its complete life cycle on detached leaves of sunflower (*Helianthus annuus*). Canadian Journal of Botany, Ottawa, 48:1811-3, 1970.
- HO, W.C. & KO, W.H. Alkalized water agar as a selective medium for enumerating soil actinomycetes. Phytopathology, St. Paul, 69(9):1031, 1979. (Abstract)
- HOMECHIN, M. Potencial e emprego de isolados brasileiros de *Trichoderma harzianum*, Rifai, para controle de patógenos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba, 1987. 186 p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- HOOKE, A.L. & YARWOOD, C.E. Culture of *Puccinia sorghi* on detached leaves of corn and *Oxalis corniculata*. Phytopathology, St. Paul, 56:536-9, 1966.
- JONES, A.L. Chemical control of phytopathogenic prokaryotes. In: MOUNT, M.S. & LACY, G.H. (coord.) Phytopathogenic prokaryotes. Academic Press, London, 1982. p. 399-413.
- KATZ, E. & DEMAIN, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. Bacteriological Review, Washington, 41:449-74, 1977.
- KERR, A. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. Plant Disease, St. Paul, 64(1):25-30, 1980.
- KIMATI, H. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: GALLI, F. (coord.) Manual de fitopatologia: doen-

ças das plantas cultivadas, 1980a. p. 297-318.

KIMATI, H. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp). In: GALLI, F. (coord.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas, 1980b. p.29-48.

KIMATI, H. Resistência de fitopatógenos a substâncias químicas usadas no controle de doenças de plantas. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 13 (1-2): 72 - 4, 1987.

KO, W. Biological control of seedling root rot of papaya caused by *Phytophthora palmivora*. Phytopatology, St. Paul, 61(7):780-2, 1971.

KO, W. Biological control of *Phytophthora* root rot of papaya with virgin soil. Plant Disease, St. Paul, 66 (6):446-8, 1982.

KUROZAWA, C. Resistência de bactérias fitopatogênicas a antibióticos. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 13 (1-2):83-90, 1987.

LANDY, M.; WARREN, G.N.; ROSENMAN, S.B.; COLIO, L.G. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. Society for Experimental Biology and Medicine Proceedings, New York, 67:539-41, 1948.

LOPES, C.A. & STALL, R.E. Controle biológico de *Pseudomonas avenae* com bactérias epífitas isoladas de plantas de milho. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 1., Piracicaba, 1986. Anais. Campinas, Fundação Cargill, 1986. p.76.

- LUMBROSO, E.; ANIKSTER, Y.; MOSEMAN, J.G.; WAHL, I. Completion life cycles of *Puccinia hordei* and *Uromyces siliarum* on detached leaves of their host. Phytopathology, St. Paul, 67:941-4, 1977.
- MEDINA, R.A.A.D. Isolamento e caracterização de um produto metabólico de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn., T41, com atividade antibiótica a fungos fitopatogênicos. Brasília, 1986. (Mestrado - Universidade de Brasília)
- MENDES, B.M.J. Influência da temperatura e do tipo de folha na quantificação de parâmetros epidemiológicos monocíclicos da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth.). Piracicaba, 1985. 83p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- MENTEN, J.O.M. Avaliação de resistência horizontal e vertical e de tolerância do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) a *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Ung.. Piracicaba, 1980. 213p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)
- MIGNUCCI, J.S. Development of soybean leaf cultures for maintenance and study of *Microsphaera diffusa*. Plant Disease Reporter, Beltsville, 62:271-3, 1978.
- MORAES, S.A. Técnica de folhas destacadas para testar reações de cultivares de amendoim (*Arachis hipogaea* L.) aos fungos *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercospora personata* (Berck & Curt) Ell. & Everth. Piracicaba, 1981. 107p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP)

- MORAES, S.A. & SALGADO, C.L. Utilização da técnica de folhas destacadas de amendoim (*Arachis hipogaea* L.) para inoculações com *Cercospora arachidicola* Hori e *Cercospora personata* (Berck & Curt) Ell. & Ev.. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 8:39-55, 1982.
- MORAES, S.A. & SAVY FILHO, A. Reações de seis cultivares de amendoim (*Arachis hipogaea* L.) a *Puccinia arachidis* Speg. Summa Phytopathologica, Piracicaba, 9: 140-53, 1983.
- MOURA, P.A.M. Aspectos econômicos da cultura do feijão. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 8(90):3-6, 1982.
- NASSER, L.C.B. Efeito da ferrugem em diferentes estágios de desenvolvimento do feijoeiro e dispersão dos esporos de *Uromyces phaseoli* var. *typica* Arth. Viçosa, 1976. 79p. (Mestrado - Universidade Federal de Viçosa)
- NORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A.; O'DONELL, A. G. The genera *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STAN, M. P. (coord.) The prokaryotes. Berlin, Springer-Verlag, 1981. p.1711-42.
- NSUMBU, N. & BOUHARMONT, J. Différenciation de racines et tiges feuillées à partir de feuillées de *Coffea canephora*. Café, Cacao, Thé, Paris, XXI(1):3-8, 1977.
- PARK, D. Antagonism - the background of soil fungi. In: PARKINSON, D. et alii (coord.) The ecology of soil fungi. Liverpool Univ. Press, 1960. p.148-59.
- PUSEY, P.L. & WILSON, C.L. Postharvest biological con-

trol of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. Plant Disease, St. Paul, 68(9):753-6, 1984.

RISHBETH, J. Stump protection against *Fomes annosus*. III. Inoculation with *Peniophora gigantea*. Ann. Appl. Biol., 52:63-77, 1963.

ROBINSON, R.A. Vertical resistance. Rev. Plant Pathol., 50:233-9, 1971.

ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.A.R.; SEIXAS, C.A.; MORAES, W.B.C. Efeito de proteção à ferrugem do cafeeiro determinado por bactérias do gênero *Bacillus*. In: REUNIÃO SOBRE CONTROLE BIOLÓGICO DE DOENÇAS DE PLANTAS, 3., Piracicaba, 1989. Anais. Departamento de Genética ESALQ - FEALQ/USP e CNPDA/EMBRAPA, 1989. p.86.

SANDERS, J.H. & SCHWARTZ, H.F. La producción de frijol y limitaciones impuestas por las plagas en América Latina. In: SCHWARTZ, H.F. & GÁLVEZ, G.E. (coord.) Problemas de Producción del Frijol, Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1980. p.1-14.

SCHROTH, M.N. & HANCOCK, J.G. Selected topics on biological control. Ann. Rev. Microbiol., 35:435-76, 1981.

STAVELY, J.R.; THOMAS, C.A.; BAKER, C.J.; MACFALL, J.S. Greenhouse control of bean rust (*Uromyces phaseoli*) with *Bacillus subtilis*. Phytopathology, St. Paul, 71(7):771, 1981. (Abstract)

SUSLOW, T.V. & SCHROTH, M.N. Role of deleterious rhizobacteria as minor pathogens in reducing crop growth. Phytopathology, St. Paul, 72:111-5, 1982.

- TUITE, J. Plant pathological methods. Burgess Publishing Company, Mineapolis, 1969. 239p.
- VAN DER PLANK, J.E. Plant diseases: epidemics and control. New York, Academic Press, 1963. 349p.
- VAN DER PLANK, J.E. Disease resistance in plants. New York, Academic Press, 1968. 206p.
- VARGAS, L. La roya. In: SCHWARTZ, W.F. & GÁLVEZ, C.E. (coord.) Problemas de Producción del Frijol, Cali, Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, cap.2, 1980. p.17-36.
- VIEIRA, C. Cultura do feijão. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1983a. 146p.
- VIEIRA, C. Doenças e pragas do feijoeiro. Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1983b. 231p.
- YARWOOD, C.E. Detached leaf culture. The Botanical Review, Lancaster, 12:1-56, 1946.
- WARD, C.H. The detached-leaf technique for testing alfalfa clones for resistance to black stem. Phytopathology, St. Paul, 49:690-6, 1959.
- WELLER, D.M. & GRAHAN, M.C. Application of fluorescent pseudomonads to improve the growth of weath. Phytopathology, St. Paul, 74:806, 1984.
- WILCOXSON, R.D.; ATIF, A.H.; KOUMAND, B. Slow rusting of weath varieties in the field correlated with stem rust

severity on detached leaves in the greenhouse. Plant Disease Reporter, Beltsville, 58:1085-87, 1974.

ZAMBOLIM, L. & CHAVES, G.M. Doenças do feijoeiro e seu controle. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 4 (46): 50-63, 1978.

ZAMBOLIM, L.; CHAVES, C.M.; MARTINS, M.C.P. Aspectos das principais doenças do feijão no Estado de Minas Gerais. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 8(90):20-9, 1982.

ZAUMEYER, W.J. & THOMAS, H.R. A monographic study of bean diseases and methods for their control. Washington, D.C., U.S.D.A., 1957. 255p. (Tech. Bull. n 868)

APÊNDICE

Apêndice 1 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
	1ª R	2ª R		
B7	114	97	105,5	0
B124	246	260	253,0	0
B10	158	280	219,0	0
B5	17	25	21,0	55,8
B161	41	41	41,0	13,7
B2	222	154	188,0	0
B12	16	33	24,5	48,4
B14	34	39	36,5	23,1
B9	16	1	8,5	82,1
B8	138	57	97,5	0
B11	23	14	18,5	61,1
B160	4	13	8,5	82,1
B3	298	99	198,5	0
B13	44	23	33,5	29,5
B125	94	63	78,5	0
B122	210	116	163,0	0
B226	6	7	6,5	86,3
Bm1	18	17	17,0	63,2
B6	21	31	26,0	45,3
Bm6	118	68	93,0	0
B231	45	49	47,0	1,0
Testemunha	55	64		
Testemunha	42	62	47,5	
Testemunha	46	3		
Testemunha	35	73		

Apêndice 2 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria (1)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
	1ª R	2ª R		
W94	1	1	1,0	98,7
B47	29	32	30,5	61,3
B52	8	18	13,0	83,5
B4	3	1	2,0	97,5
W471	2	1	1,5	98,1
W49	2	5	3,5	95,5
W12	13	10	11,5	85,4
W48	8	4	6,0	92,4
W105	2	5	3,5	95,5
B48	22	4	13,0	83,5
Testemunha	101	73	78,8	
Testemunha	39	102		

W181	9	3	6,0	96,2
W183	9	9	9,0	94,2
W332	10	9	9,5	93,9
W115	8	8	8,0	94,9
Bm4	16	13	14,5	90,7
W42	14	5	9,5	93,9
B68	18	16	17,0	89,1
W203	4	2	3,0	98,1
W401	1	7	4,0	97,4
W85	0	0	0	100,0
Testemunha	268	199	156,0	0
Testemunha	35	122		

(1) As bactérias designadas pela letra B foram isoladas do filoplano do feijoeiro ou do solo cultivado com feijoeiro e as designadas pela letra W foram cedidas pelo Dr. Wagner Bettiol (CNPDA-EMBRAPA) e identificadas como *B. subtilis*.

Apêndice 3 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
	1ª R	2ª R		
B74	142	218	180,0	0
B73	83	18	50,5	67,2
B178	51	65	58,0	62,3
B218	36	16	26,0	83,9
B176	154	77	115,0	24,9
B93	91	75	83,0	46,0
B102	22	11	16,5	89,3
B71	61	116	88,5	42,4
B82	12	7	9,5	93,4
B46	49	27	38,0	75,3
Testemunha	240	183	153,7	0
Testemunha	139	53		

B96	1	0	0,5	99,6
B103	296	290	293,0	0
B222	104	88	96,0	30,6
B204	97	173	135,0	2,4
B45	127	71	99,5	28,3
B100	45	18	31,5	77,2
B197	113	95	104,0	24,8
B59	149	92	120,5	12,8
B72	167	258	212,5	0
Testemunha	195	97	138,2	0
Testemunha	142	119		

Apêndice 4 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (1) nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
	(transmitância)	(1) $\frac{1^a R}{2^a R}$		
B85	11	57	38,5	57,1
B91	17	40	54,0	39,8
B25	25	39	43,0	52,1
B83	14	23	52,0	42,1
B24	16	29	27,5	69,4
B35	13	75	65,5	27,0
B34	28	78	50,0	44,3
B92	14	102	60,5	32,6
B32	70	10	18,5	79,4
Testemunha	100	96	89,8	0
Testemunha	100	77		

B33	17	96	82,5	30,1
B77	21	84	51,5	56,4
B86'	25	3	6,0	94,9
B29	95	59	61,5	47,9
B36	63	29	16,0	86,4
B76	7	23	39,5	66,5
B23	22	41	31,0	73,7
B21	13	46	30,5	74,2
B30	14	41	30,0	74,6
B90	7	68	46,5	60,6
Testemunha	100	141	118,0	0
Testemunha	100	103		
		175		
		53		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 5 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (1) (transmitância)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
		1ª R	2ª R		
B28	12	25	20	22,5	66,9
B87	11	33	116	74,5	0
B95	97	12	13	12,5	81,6
B168	36	43	22	32,5	52,2
B104	45	21	2	11,5	83,1
B129	10	19	52	35,5	47,8
B106	52	4	1	2,5	96,3
B31	83	33	26	29,5	56,6
B75	22	9	3	6,0	91,2
Testemunha	100	58	74	68,5	0
Testemunha	100	68	72		
B37	12	11	2	7,5	87,6
B81	85	50	31	40,5	33,1
B80	16	19	28	23,5	61,2
B39	40	31	31	31,0	48,8
B123	17	7	20	13,5	77,7
B86	7	20	3	11,5	81,0
B38	12	30	40	35,0	42,1
B145	10	20	7	13,5	77,5
B148	24	40	62	51,0	15,7
Testemunha	100	71	50	60,5	0
Testemunha	100	49	72		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 6 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (1) (transmitância)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
		1ª R	2ª R		
B19	11	104	79	91,5	40,0
B58	20	148	149	148,5	2,6
B56	34	171	254	212,5	0
B62	9	102	160	131,0	14,1
B20	16	171	173	172,0	0
B15	8	232	276	254,0	0
B53	9	81	132	106,5	30,2
B70	23	247	131	189,0	0
B64	59	139	248	193,0	0
B57	25	79	142	110,5	27,5
Testemunha	100	155	184	152,5	0
Testemunha	100	120	151		
<hr/>					
B54	70	126	57	91,5	41,7
B18	10	183	204	193,5	0
B16	14	170	164	167,5	0
B15	19	189	115	152,0	3,2
B69	50	158	116	137,0	12,7
B53'	15	98	54	76,0	51,6
B63	10	171	216	193,0	0
B65	5	67	87	77,0	51,0
B60	22	79	89	84,0	46,5
B61	15	100	109	104,5	33,4
Testemunha	100	163	183	157,0	0
Testemunha	100	66	216		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 7 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (transmitância)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
		1ª R	2ª R		
B215	10	92	73	82,5	42,3
B186	11	80	167	123,5	13,6
B209	7	64	19	41,5	71,0
B174	29	62	150	106,0	25,9
B208	17	62	51	56,5	60,5
B187	22	0	0	0	100,0
B155	52	49	89	69,0	51,8
B212	13	132	90	111,0	22,4
B185	55	90	68	79,0	44,8
Testemunha	100	106	184	143,0	0
Testemunha	100	167	115		
<hr/>					
B175	25	0	0	0	100,0
B217	10	11	86	48,5	39,4
B213	13	50	43	46,5	41,9
B135	24	17	61	39,0	51,2
B132	45	4	10	7,0	91,2
B214	44	60	21	40,5	49,4
B151	12	39	67	53,0	33,8
B210	17	59	79	69,0	13,8
Testemunha	100	63	103	80,0	0
Testemunha	100	113	41		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 8 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (1) nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
	(transmitância)	1ª R	2ª R	
B229	30	18	5	11,5
B149	12	132	79	105,5
B115	10	43	83	63,0
B159	14	81	75	78,0
B130	22	61	98	79,5
B232	24	96	46	71,0
B227	79	71	37	54,0
B211	36	2	2	2,0
Testemunha	100	121	124	110,2
Testemunha	100	112	84	0
<hr/>				
B228	8	63	11	37,0
B101	40	70	68	69,0
B146	26	41	70	55,5
B147	23	12	32	22,0
B157	12	79	104	91,5
B225	17	53	60	56,5
B136	20	105	95	100,0
B51	8	34	25	29,5
Testemunha	100	71	116	86,0
Testemunha	100	86	71	0

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 9 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (1)		nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
	(transmitância)	(1)	1ª R	2ª R		
B167	30		60	54	57,0	26,5
B121	11		67	142	104,5	0
B131	12		86	51	68,5	11,6
B110	26		47	93	70,0	9,7
B233	41		46	32	39,0	49,7
B169	36		71	69	70,0	9,7
B111	53		78	49	63,5	18,1
B230	26		23	17	20,0	74,2
B152	82		52	29	40,5	47,8
Testemunha	100		124	51	77,5	0
Testemunha	100		58	77		
Bm2	11		47	6	26,5	72,1
B170	40		5	21	13,0	86,3
B171	18		110	110	110,0	0
B172	14		172	140	156,0	0
B166	50		27	20	23,5	75,3
B220	17		70	152	111,0	0
B67	41		140	200	170,0	0
B112	52		20	51	35,5	62,6
B200	28		118	144	131,0	0
Testemunha	100		95	111	95,0	0
Testemunha	100		103	71		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 10 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (1) (transmitância)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
		1ª R	2ª R		
B113	25	11	29	20,0	87,6
B109	30	69	101	85,0	47,3
B190	17	1	3	2,0	98,8
B180	22	101	104	102,5	36,4
B118	22	128	99	113,5	29,6
B119	12	64	31	47,5	70,6
B179	26	126	213	169,5	0
B223	16	62	88	75,0	53,5
B193	9	181	120	150,5	6,7
B218	11	120	110	115,0	28,7
Testemunha	100	186	73	161,2	0
Testemunha	100	150	236		
B203	49	39	39	39,0	65,8
B127	4	15	25	20,0	82,5
B126	10	132	87	109,5	4,0
B204	20	31	21	26,0	77,2
B189	12	85	44	64,5	43,4
B177	5	122	14	68,0	40,4
B207	7	114	92	103,0	9,6
B163	35	159	76	117,5	0
B192	15	25	39	32,0	71,9
B221	15	53	39	46,0	59,6
Testemunha	100	124	161	114,0	0
Testemunha	100	67	104		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 11 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (transmitância) (1)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
		1ª R	2ª R		
B50	85	20	10	15,0	85,0
B196	29	0	0	0	100,0
B144	14	103	90	96,5	3,3
B140	10	19	13	16,0	84,0
B154	17	52	52	52,0	48,1
B142	19	50	85	67,5	32,7
B22	95	35	73	54,0	46,1
B107	35	37	63	50,0	50,1
B114	10	88	65	76,5	23,7
B143	40	47	10	28,0	71,6
Testemunha	100	103	100	100,2	0
Testemunha	100	89	109		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 12 - Efeito de bactérias isoladas do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria	concentração (transmitância) (1)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
		1ª R	2ª R		
B201	5	139	100	119,5	17,5
B206	16	5	5	5,0	95,9
B194	40	*	*	-	-
B202	30	17	26	21,5	78,6
B195	31	74	83	78,5	31,6
B138	20	3	2	2,5	98,4
B173	15	124	141	132,5	0
B199	12	98	130	114,0	0
Testemunha	100	119	115	121,2	0
Testemunha	100	147	104		

* - o isolado B194 provocou encharcamento e morte da folha.

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 13 - Efeito de fungos isolados do filoplano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Fungo	concentração (1) nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
	(transmitância)	1ª R	2ª R	
F16	64	75	80	77,5
F4	20	154	111	132,5
F25	12	122	73	97,5
F108	30	148	160	154,0
F109	55	128	187	157,5
F21	20	129	187	158,0
F3	21	88	109	98,5
F82	44	180	224	202,0
F29	95	218	215	216,5
Testemunha	100	270	316	264,8
Testemunha	100	202	271	0

F2	30	158	127	142,5
F27	55	168	155	161,5
F111	15	173	155	164,0
F1	57	159	126	142,5
F6	15	187	168	177,5
F7	75	95	67	81,0
F99	7	185	251	218,0
F28	75	103	114	108,5
F106	33	204	180	192,0
F5	95	66	45	55,5
Testemunha	100	154	148	173,8
Testemunha	100	243	150	0

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 14 - Efeito de actinomicetos isolados do filopiano ou do solo no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Actinomiceto	concentração (1) (transmitância)	nº de pústulas de ferrugem/folha		média	% de inibição
		1ª R	2ª R		
A33	95	110	194	152,0	10,2
A36	89	94	134	114,0	32,6
A10	81	121	149	135,0	20,2
A20	55	141	149	145,0	14,3
A41	94	188	157	172,5	0
A62	81	180	176	178,0	0
A24	97	124	122	123,0	27,3
A21	88	123	178	150,0	11,0
A59	90	158	153	155,5	8,1
A26	88	81	119	100,0	40,9
Testemunha	100	86	156	169,2	0
Testemunha	100	225	210		
A57	93	198	104	151,0	7,6
A16	97	82	117	99,5	39,1
A15'	99	131	95	113,0	30,9
A15	92	130	107	118,5	27,5
A41	91	102	89	95,5	41,5
A53	95	114	167	140,5	14,1
A42	96	130	156	143,0	12,5
A29	95	167	157	162,0	0,9
A12	97	130	122	126,0	22,9
A25	99	96	92	94,0	42,5
Testemunha	100	124	165	163,5	0
Testemunha	100	112	253		

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 15 - Porcentagem de inibição na formação de pústulas de ferrugem do feijoeiro obtida nos testes da segunda fase de seleção preliminar, efetuados para confirmar a ação antagonônica das bactérias já testadas.

Bactéria	concentração (transmitância)(1)	nº de pústulas de ferrugem/folha				média	% de inibição
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R		
Bm1	10	125	106	110	149	122,50	35,44
B160	12	28	76	119	83	76,50	59,68
B102	5	69	137	170	91	116,75	38,47
B175	22	3	10	7	3	5,75	96,97
B106	50	1	14	6	12	8,25	95,65
Testemunha	100	215	172	194	178	189,75	0
B187	23	5	5	4	4	4,50	97,10
B226	25	135	75	74	126	102,50	33,76
Testemunha	100	127	196	158	138	154,75	0

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 16 - Porcentagem de inibição na formação de pústulas de ferrugem do feijoeiro obtida nos testes da segunda fase de seleção preliminar, efetuados para confirmar a ação antagonônica das bactérias já testadas.

Bactéria	concentração (transmitância) (1)	nº de pústulas de ferrugem/folha				média	% de inibição
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R		
W85	12	40	54	45	43	45,50	83,05
W49	6	78	35	26	40	44,75	83,33
B132	12	9	16	5	12	10,50	96,10
B196	12	5	13	13	3	8,50	96,83
Bm4	20	247	204	277	290	254,50	5,21
Testemunha	100	247	288	320	219	268,50	0
B11	3	3	10	7	0	5,00	97,80
B96	19	23	14	16	26	19,75	91,32
B4	12	317	198	153	230	224,50	1,32
B86'	12	287	154	148	180	192,25	15,49
B74	3	103	187	15	123	107,00	52,97
Testemunha	100	130	141	430	209	227,50	0

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 17 - Porcentagem de inibição na formação de pústulas de ferrugem do feijoeiro obtida nos testes da segunda fase de seleção preliminar, efetuados para confirmar a ação antagonônica das bactérias já testadas.

Bactéria	concentração (1)	nº de pústulas de ferrugem/folha				média	% de inibição
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R		
B206	8	2	5	2	10	4,75	98,67
B138	15	0	0	0	0	0	100,00
B6	11	108	110	121	149	122,00	65,78
B226	9	227	153	219	130	182,25	48,88
B37	4	119	174	196	183	168,00	52,81
Testemunha	100	265	290	455	416	356,50	0
W94	15	56	38	47	40	45,25	76,43
W183	15	34	19	40	60	38,25	80,08
W105	12	55	54	44	57	52,50	72,66
W471	11	30	48	58	34	42,50	77,86
W181	12	48	73	36	40	49,25	74,35
Testemunha	100	153	217	176	222	192,00	0

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 18 - Porcentagem de inibição na formação de pústulas de ferrugem do feijoeiro obtida nos testes da segunda fase de seleção preliminar, efetuados para confirmar a ação antagonônica das bactérias já testadas.

Bactéria	concentração (transmitância)(1)	nº de pústulas de ferrugem/folha				média	% de inibição
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R		
B175	5	2	0	1	0	0,75	99,25
B187	5	0	0	1	0	0,25	99,75
B52	5	100	57	87	99	85,75	14,46
B140	5	87	60	54	56	64,25	35,91
B5	5	69	76	145	138	107,00	0
Testemunha	100	79	113	69	140	100,25	0
W401	13	6	7	6	15	8,50	93,6
W12	9	4	5	12	13	8,50	93,6
W48	10	15	6	4	10	8,75	93,4
W203	14	35	16	23	9	20,75	92,1
W332	11	12	7	12	11	10,50	92,1
Testemunha	100	142	89	152	147	132,50	0

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 19 - Efeito da aplicação de suspensões com diferentes concentrações dos isolados de bactérias antagonistas pertencentes ao grupo I (B96, B187, B175 e B206) no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria antagônica	concentração (transmitância)	(1)	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
			1ª R	2ª R	3ª R	4ª R	
B96	5		99,7	98,7	100,0	100,0	99,6
B96	10		99,7	99,7	99,7	100,0	99,8
B96	20		97,7	99,3	98,0	98,0	98,2
B96	82		64,1	68,4	61,5	65,8	65,0
B187	10		99,4	99,4	99,7	99,4	99,5
B187	20		100,0	99,1	100,0	99,4	99,6
B187	83		83,6	85,1	86,4	87,0	85,5
B175	10		98,1	99,4	99,1	100,0	99,2
B175	20		94,1	97,8	97,8	96,9	96,6
B175	84		80,8	74,6	87,0	72,1	78,6
B206	5		99,4	100,0	100,0	100,0	99,8
B206	10		98,2	98,2	98,8	98,8	98,5
B206	20		93,6	96,5	94,2	92,4	94,2
B206	83		63,2	72,5	58,5	64,9	64,8
B206	99		0	29,8	0	0	7,4

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 20 - Efeito da aplicação de suspensões com diferentes concentrações dos isolados de bactérias antagonistas pertencentes ao grupo 2 (B138, B132, B106 e B196) no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria antagônica	concentração (transmitância) (1)	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R	
B138	12	99,0	100,0	100,0	100,0	99,8
B138	74	41,9	46,4	70,2	39,0	49,4
B132	5	98,5	100,0	100,0	99,0	99,4
B132	12	98,5	100,0	99,0	92,6	97,5
B132	72	0	50,9	72,7	44,4	42,0
B106	5	82,4	95,0	97,5	95,0	92,5
B106	12	96,4	91,8	89,9	99,4	94,5
B106	75	0	0	29,6	50,3	20,0
B196	12	82,4	75,5	88,0	78,6	81,1
B196	73	34,6	36,5	8,8	0	20,0

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 21 - Efeito da aplicação de suspensões com diferentes concentrações do isolado de bactéria antagonista pertencente ao grupo 3 (B11) no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria antagônica	concentração (transmitância) ⁽¹⁾	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R	
B11	5	89,2	88,7	71,9	68,0	79,4
B11	10	56,4	13,8	3,9	11,8	21,5
B11	20	21,7	67,5	37,9	39,9	41,7
B11	82	0,5	9,4	16,3	11,3	9,4

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 22 - Efeito da aplicação de suspensões com diferentes concentrações dos isolados de bactérias antagonistas pertencentes ao grupo 4 (W401, W48 e W85) no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria antagonista	concentração (transmitância)	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R	
W401	5	98,6	98,2	97,7	97,7	98,0
W401	10	94,6	90,3	92,2	94,0	92,8
W401	75	78,3	83,4	76,5	71,9	77,5
W401	96	45,6	30,8	16,5	38,6	32,9
W48	5	94,9	92,3	96,4	95,9	94,8
W48	10	94,4	95,4	91,8	88,2	92,4
W48	73	72,3	78,0	65,7	80,5	74,1
W85	5	95,9	95,4	92,3	97,5	95,3
W85	10	86,2	91,8	94,9	92,3	91,3
W85	73	81,0	83,6	77,0	68,2	77,4

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 23 - Efeito da aplicação de suspensões com diferentes concentrações dos isolados de bactérias antagonistas B206, B138 e W401, pertencentes aos grupos 1, 2 e 4 respectivamente, no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Bactéria antagônica	concentração (transmitância)	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R	
B206	5	100,0	99,3	98,6	99,3	99,3
B206	10	97,9	95,8	97,2	97,9	97,2
B206	73	76,9	90,2	86,7	82,5	84,1
B138	5	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
B138	10	99,3	100,0	100,0	100,0	99,8
B138	70	76,3	74,9	77,5	47,1	68,8
W401	5	99,3	99,3	100,0	100,0	99,6
W401	10	100,0	99,3	100,0	98,3	99,5
W401	73	90,9	94,4	94,4	79,7	89,8

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 24 - Efeito dos isolados B206, B138 e W401 cultivados em meios de cultura líquidos (BD e NYO) e dos filtrados das culturas (F) no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Tratamento		redução no número				
Bactéria antagônica	meio de cultura	concentração (transmitância) (1)	de pústulas de ferrugem (%)			
			1ª R	2ª R	3ª R	4ª R
B206	BD	21	32,9	6,6	9,2	0
B138	BD	78	0	3,9	0	0
W401	BD	35	100,0	100,0	100,0	100,0
B206	NYO	37	100,0	100,0	100,0	98,4
B138	NYO	39	63,0	76,1	56,4	67,9
W401	NYO	36	100,0	96,7	98,4	97,5
B206 (F)	BD	(21)	90,3	91,7	90,3	91,0
B138 (F)	BD	(78)	10,0	6,6	0	0
W401 (F)	BD	(35)	99,3	100,0	99,3	99,3
B206 (F)	NYO	(37)	5,1	17,3	25,4	24,1
B138 (F)	NYO	(39)	0	2,4	10,5	0
W401 (F)	NYO	(36)	93,2	82,4	98,6	89,2

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 25 - Efeito do isolado B206 cultivado no meio líquido NY com diferentes concentrações de NaCl e dos filtrados das culturas (F) no desenvolvimento de pústulas de ferrugem (*Uromyces phaseoli*) em folhas destacadas de feijoeiro, cultivar Rosinha.

Tratamento (1)	concentração (transmitância) (2)	redução no número de pústulas de ferrugem (%)			média
		1ª R	2ª R	3ª R	
B206-NY6	30	96,4	96,4	100,0	97,6
B206-NY5	33	100,0	95,4	100,0	98,5
B206-NY4	35	100,0	100,0	100,0	100,0
B206-NY3	33	100,0	97,4	97,4	98,3
B206-NY2	38	100,0	100,0	96,0	98,7
B206-NY1	35	91,9	86,5	90,6	89,7
B206-NY0	34	82,7	100,0	84,4	89,0
B206-BD	23	0	13,7	64,2	26,0

B206-NY6 (F)	(30)	75,8	61,2	80,6	72,5
B206-NY5 (F)	(33)	81,1	66,9	83,4	77,1
B206-NY4 (F)	(35)	87,9	69,7	57,6	71,7
B206-NY3 (F)	(33)	88,0	80,0	76,0	81,3
B206-NY2 (F)	(38)	74,6	40,3	77,1	64,0
B206-NY1 (F)	(35)	74,2	39,0	37,9	50,4
B206 NY0 (F)	(34)	33,5	23,0	34,7	30,4
B206-BD (F)	(23)	56,2	70,8	62,8	63,3

(1) NY6 - 8 g NaCl/l de NY - fitotóxico ao feijoeiro; NY5 - 6 g NaCl/l de NY - fitotóxico ao feijoeiro; NY4 - 4 g NaCl/l de NY - fitotóxico ao feijoeiro; NY3 - 3 g NaCl/l de NY - fitotóxico ao feijoeiro; NY2 - 2 g NaCl/l de NY - não fitotóxico ao feijoeiro; NY1 - 1 g NaCl/l de NY - não fitotóxico ao feijoeiro; NY0 - 0 g de NaCl/l de NY - não fitotóxico ao feijoeiro.

(2) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 26 - Termoeestabilidade da substância antagonista produzida pelos isolados W401 (*Bacillus subtilis*) e B206 nos meios de cultura líquidos BD e NY2.

Tratamento			concentração (transmitância)	redução no número de pústulas de ferrugem (%)		
Bactéria antagonista	meio de cultura	forma de aplicação		1ª R 2ª R 3ª R		
				1ª R	2ª R	3ª R
W401	BD	não-autoclavado	52	100,0	100,0	100,0
W401	BD	filtrado	(52)	100,0	100,0	96,9
W401	BD	autoclavado	(52)	97,8	97,8	98,9
B206	NY2	não-autoclavado	20	100,0	98,1	98,7
B206	NY2	filtrado	(20)	66,9	61,0	59,1
B206	NY2	autoclavado	(20)	81,9	83,0	72,9
B206	BD	não-autoclavado	13	65,9	74,4	84,4
B206	BD	filtrado	(13)	51,6	9,9	0
B206	BD	autoclavado	(13)	62,2	64,7	74,4

(1) comprimento de onda de 625 nm.

Apêndice 27 - Efeito residual do isolado de bactéria antagonista Bl87 determinado em casa-de-vegetação para controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*).

Tratamento ⁽¹⁾	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
	1ª R	2ª R ⁽²⁾	3ª R	4ª R	
D1 - 0 horas	97,4	97,4	99,2	100,0	98,5
D2 - 24 horas	82,2	61,8	83,2	72,2	74,8
D3 - 48 horas	72,5	80,2	28,2	80,2	65,3
D4 - 72 horas	81,8	77,1	66,3	78,4	75,9
D5 - 96 horas	41,5	8,7	11,3	15,1	19,2
D6 - 120 horas	21,5	51,3	38,3	43,7	38,8
D7 - 144 horas	39,1	57,7	23,1	0	30,0
D8 - 168 horas	28,5	32,6	37,8	34,2	33,3

(1) horas a partir da aplicação do antagonista.

(2) parcela constituída por uma vaso contendo quatro plantas.

Apêndice 28 - Efeito residual do isolado de bactéria antagonica B206 determinado em casa-de-vegetação para controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*).

Tratamento ⁽¹⁾	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
	1ª R	2ª R ⁽²⁾	3ª R	4ª R	
D1 -- 0 horas	98,6	89,3	94,5	97,8	95,0
D2 - 24 horas	86,4	78,4	82,9	59,2	76,7
D3 - 48 horas	28,3	23,2	68,2	0	29,9
D4 - 72 horas	76,2	54,9	66,4	26,2	55,9

(1) horas a partir da aplicação do antagonista.

(2) parcela constituída por um vaso contendo quatro plantas.

Apêndice 29 - Efeito residual do isolado de bactéria antagonista W401 determinado em casa-de-vegetação para o controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*).

Tratamento ⁽¹⁾	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
	1ª R	2ª R ⁽²⁾	3ª R	4ª R	
D1 - 0 horas	99,1	97,4	100,0	98,2	98,7
D3 - 48 horas	97,8	99,2	99,8	98,8	98,9
D5 - 96 horas	98,5	0	91,2	78,9	67,2
D6 - 120 horas	66,7	89,7	73,1	88,5	79,5

(1) horas a partir da aplicação do antagonista.

(2) parcela constituída por um vaso contendo duas plantas.

Apêndice 30 - Efeito residual do isolado de bactéria antagonista B138 determinado em casa-de-vegetação para controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces phaseoli*).

Tratamento ⁽¹⁾	redução no número de pústulas de ferrugem (%)				média
	1ª R	2ª R ⁽²⁾	3ª R	4ª R	
D1 - 0 horas	91,0	93,4	75,1	86,4	86,5
D2 - 24 horas	82,6	83,3	93,9	89,4	87,3
D3 - 48 horas	91,4	68,6	100,0	88,6	87,2
D5 - 96 horas	87,6	96,6	78,6	89,9	88,2

(1) horas a partir da aplicação do antagonista.

(2) parcela constituída por um vaso contendo quatro plantas.

Apêndice 31 - Poder erradicante dos isolados de bactérias antagonicas selecionadas sobre *Uromyces phaseoli*, agente causal da ferrugem do feijoeiro.

Tratamento	concentração (transmitância) ⁽¹⁾	redução na viabilidade de esporos de <i>U. phaseoli</i> (%)				média
		1ª R	2ª R	3ª R	4ª R	
B138 em H ₂ O + Tween 20	5	31,9	8,0	9,1	50,7	24,9
B206 em H ₂ O + Tween 20	5	71,6	72,0	55,6	75,9	68,8
W401 em H ₂ O + Tween 20	5	58,5	64,1	56,0	66,2	61,2
B 206 em NYO	41	28,9	1,6	15,3	0,7	11,6
W401 em BD	33	32,3	18,7	26,4	14,5	23,0

(1) comprimento de onda de 625 nm.