

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS

CURSO DE AGRONOMIA

RELATORIO DE ESTAGIO EXTRACURRICULAR
EM
FITOPATOLOGIA

MIGUEL MICHEREFF FILHO

FLORIANOPOLIS - SC

MARÇO - 1993

138683

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho tem com objetivo relatar as atividades como estagiário no Laboratório de Fitobacteriologia da Area de Fitossanidade do Departamento de Agronomia, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em Recife, no período de 06 de janeiro a 08 de março de 1993, sob orientação da Profa. Dra. Rosa de Lima Ramos Mariano.

A primeira parte deste relatório aborda as atividades principais do estágio, que constituíram de estudos experimentais visando o biocontrole da queima-das-folhas do inhame, causada por *Curvularia eragrostidis*, através da utilização de bactérias do gênero *Pseudomonas* do grupo fluorescente. A segunda parte aborda as atividades complementares desenvolvidas visando o necessário aprimoramento em princípios e métodos de Fitopatologia.

Miguel Michereff Filho
Miguel Michereff Filho

SUMARIO

APRESENTAÇÃO

PARTE I - EXPERIMENTAÇÃO

- BIOCOTROLE DA QUEIMA-DAS-FOLHAS DO INHAME, CAUSADA POR <i>CURVULARIA ERAGROSTIDIS</i> , ATRAVES DE BACTERIAS FLUORESCENTES DO GENERO <i>PSEUDOMONAS</i>	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. MATERIAL E METODOS	10
2.1. Seleção Preliminar de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes com Potencial de Biocontrole da Queima das Folhas do inhame	10
2.2. Influência do Período de Aplicação de <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescentes no Biocontrole da Queima das Folhas do Inhame	13
2.3. Análise das Interações Antagônicas entre <i>Pseudomonas</i> spp. Fluorescentes e <i>Curvularia eragrostidis</i> em Condições de Laboratório	14
2.3.1. Método da Cultura Pareada	14
2.3.2. Método do Papel Celofane	15
2.3.3. Método da Germinação de Conídios em Lâmina Escavada	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	33

PARTE II - ATIVIDADES COMPLEMENTARES

- FITOBACTERIOLOGIA	41
- FUNGOS FITOPATOGENICOS	44

PARTE I - EXPERIMENTAÇÃO

BIOCONTROLE DA QUEIMA-DAS-FOLHAS DO INHAME, CAUSADA
POR *CURVULARIA ERAGROSTIDIS*, ATRAVES DE BACTERIAS
FLUORESCENTES DO GENERO *PSEUDOMONAS*

1. INTRODUÇÃO

O inhame, *Dioscorea* spp., é um dos principais alimentos em muitos países tropicais (MAFRA, 1986). Mundialmente, a produção atinge aproximadamente 23,46 milhões de toneladas, com maior concentração no continente Africano. No Brasil, principal produtor latino-americano, a safra atinge cerca de 210 mil toneladas, correspondendo a 0,9 % da produção mundial (FAO, 1990). A nível nacional destacam-se como principais produtores os Estados de Pernambuco e Paraíba (MAFRA, 1986; MOURA & MOURA, 1989).

A planta de inhame produz dois tipos de túberas: as túberas comerciais, colhidas cinco meses a partir do plantio e as túberas-sementes, colhidas três meses após a colheita das túberas comerciais (SILVA, 1960). A espécie predominante nos campos de produção do Nordeste brasileiro é *D. cayennensis* Lam. (MOURA, 1990), que possui uma única cultivar, conhecida vulgarmente por cará-da-costa, inhame-da-costa ou simplesmente inhame (VEIGA, 1974). Suas túberas comerciais constituem-se em produto agrícola de alto valor econômico para os mercados interno e externo (MOURA & MOURA, 1989), sendo uma excelente fonte de energia,

apresentando cerca de 30% de carboidratos, 1,5% de proteínas e alta concentração de vitaminas do complexo B. Além disso, o plantio dessa cultivar também é justificado pela resistência à "requeima", doença de etiologia desconhecida, que comumente inviabiliza o cultivo das variedades cará-de-São-Tomé e cará-nambú, pertencentes a *D. alata* (SILVA, 1971).

Mesmo apresentando fácil manejo, os problemas fitossanitários assumem grande importância para a rentabilidade da cultura do inhame, por diminuírem a produtividade, ocasionarem perdas durante o transporte e armazenamento e, por reduzirem o valor unitário das túberas no comércio interno e nas exportações. Dentre estes problemas, a queima-das-folhas ou pinta-prêta, causada pelo fungo *Curvularia eragrostidis* (Hennings) Meyer, destaca-se pela alta incidência e severidade em todas as áreas de produção de inhame no Nordeste (MOURA, 1990). Frequentemente a níveis epidêmicos, esta enfermidade provoca grandes perdas nos plantios irrigado e de sequeiro, chegando a reduzir em cerca de 35 a 40% o peso das túberas comerciais (SISTEMA, 1985).

O sintoma primário da queima-das-folhas apresenta-se como uma mancha foliar necrótica, de coloração marrom-escura, frequentemente circundada por um halo amarelo. As manchas que tendem para o formato circular, atingem em média 2 a 3 cm de diâmetro, sendo limitadas parcialmente pelas nervuras do limbo foliar. É comum a coalescência de manchas, formando-se grandes áreas necrosadas. Em menor frequência, ocorrem lesões nos pecíolos e nos ramos. Quando incide sobre plantas jovens, que possuem folhas em desenvolvimento, o crescimento da hospedeira é

significativamente afetado e as folhas retorcidas, apresentam um quadro típico de crestamento com nanismo. As perdas nesses casos são sempre elevadas. Os sintomas secundários são o mau desenvolvimento da planta e o pequeno tamanho das túberas comerciais e túberas-sementes. Nos casos extremos de alta incidência e severidade, formam-se grandes reboleiras, apresentando plantas queimadas e mortas (MOURA, 1990).

O controle da queima-das-folhas é realizado principalmente através de pulverizações preventivas (MOURA, 1990) ou após o aparecimento dos primeiros sintomas (VEIGA, MOURA & SENA, 1971), com fungicidas à base de maneb (etileno bis-ditiocarbamato de manganês) e mancozeb (etileno bis-ditiocarbamato de manganês e zinco), a intervalos semanais ou quinzenais, em todas as áreas de produção, independente da época do ano ou idade da planta (SISTEMA, 1985; MOURA, 1990). Embora sendo uma prática extensivamente utilizada para o controle dessa enfermidade, existem preocupações crescentes quanto a perda de eficiência dos fungicidas (RAMOS, 1991).

Considerando o incremento dos custos do controle químico, a perda da eficiência de alguns desses produtos e os problemas ambientais advindos dessas práticas, observa-se a necessidade da busca de alternativas para o controle de fitopatógenos, dentre as quais o controle biológico pode constituir uma das opções mais viáveis (COOK & BAKER, 1983).

O principal objetivo do controle biológico é manter, através de certas práticas e da introdução de uma biomassa de

antagonistas, todos os componentes do agroecossistema em perfeito equilíbrio, constituído pelo hospedeiro cultivado juntamente com os patógenos e os organismos úteis (ROBBS, 1991).

Embora o controle de fitopatógenos habitantes do solo seja mais estudado e tenha alcançado melhores resultados, recentes progressos demonstraram a viabilidade do biocontrole de patógenos da aérea de plantas.

SUDO (1989) relata o controle de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores da lixa do coqueiro, com *Acremonium alternatum* e *Acremonium persicinum*, hiperparasitas isolados diretamente dos estromas dos patógenos, sendo multiplicados e pulverizados nos talhões de coqueiro afetados pela lixa, cujas plantas estão no início da frutificação, época mais prejudicial da doença e quando o antagonista não está presente. Com pulverização de *Verticillium lecanii* em plantas de cravo inoculadas com *Uromyces dianthi*, SPENCER (1980) obteve redução da ferrugem. Aplicando semanalmente suspensão de esporos de *Ampelomyces quisqualis* em pepino, sob condições de casa-de-vegetação, SUNDHEIM & AMUNDSEN (1982) obtiveram aumentos superiores a 50% na produção. LOPES (1986), utilizando *Pseudomonas fluorescens*, isolado do cartucho de milho, verificou efetivo controle de *Pseudomonas avenae* do milho em condições de campo. Em ensaios sob condições controladas, FRAVEL & SPURR (1977) verificaram que *Bacillus cereus* subsp. *mycoides*, isolado de folhas, controlou *Alternaria alternata* em fumo. FOKKEMA & VAN DER MEULEN (1976), com a aplicação das leveduras *Sporobolomyces*

roseus, *Aureobasidium pullulans* e *Cryptococcus laurentii* var. *florescens*, residentes do filoplano, obtiveram redução de 50% ou mais na infecção de folhas de trigo com *Septoria nodorum*,

Embora o controle biológico de doenças no filoplano tenha sido amplamente revisado (BLAKEMAN & FOKKEMA, 1982; RISHBETH, 1988; BETTIOL, 1991b; ANDREWS, 1992), estudos buscando a utilização de agentes biocontroladores de *C. eragrostidis* ainda são pouco significativos.

A seleção de microrganismos antagônicos constitui a base fundamental de todo o programa de controle biológico de doenças de plantas, determinando as chances de sucesso (BETTIOL, 1991a). Todos os métodos de seleção de antagonistas são baseados em evidências de que o organismo candidato interfere, de algum modo, no desenvolvimento do patógeno ou reduz a doença, sendo que a interferência implica em algumas formas de destruição ou inibição (ANDREWS, 1985).

A utilização de bactérias para o controle de doenças de plantas tem sido evidenciada por vários autores (VIDAVER, 1982; SCHROTH, LOPER & HILDEBRAND, 1984; KNUDSEN & SPURR, 1988; ROBBS, 1991). Bactérias do gênero *Pseudomonas*, pertencentes ao grupo fluorescente, residentes naturais do rizoplano e rizosfera (KLOPPER et al., 1980; SUSLOW & SCHROTH, 1982; WELLER, 1988; LIEVENS et al., 1989), bem como do filoplano (BLAKEMAN et al., 1977; BRIAN et al., 1977; MORRIS & ROUSSE, 1985; LOPES, 1986), podem constituir-se em potenciais agentes de biocontrole de patógenos da parte aérea.

O presente trabalho teve como objetivo investigar as potencialidades do controle de *Curvularia eragrostidis*, agente da queima-das-folhas, do inhame através de *Pseudomonas* spp. fluorescentes

2. MATERIAL E METODOS

Os estudos foram conduzidos em condições de casa-de-vegetação e no Laboratório de Fitobacteriologia da Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Como fitopatógeno empregou-se um isolado de *Curvularia eragrostidis* (CE-1), obtido de folhas de inhame com sintomas de queima, enquanto como candidatos antagonistas foram utilizados 50 isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, obtidos do rizoplano de caupi (CR), feijão (FR) e tomate (TR).

2.1. Seleção Preliminar de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes com Potencial de Biocontrole da Queima-das-Folhas do Inhame

2.1.1. Preparo do Inóculo

a) *Curvularia eragrostidis*

Em condições assépticas, com auxílio de uma alça de platina flambada, efetuou-se a transferência de estruturas de *C. eragrostidis*, removidas de cultura em tubo, para placas de Petri contendo meio BDA (200 g de batata; 20 g de dextrose; 17 g de ágar; 1000 ml de água destilada). Após oito dias de incubação, a cada placa foram adicionados 20 ml de água destilada

esterilizada, procedendo-se à remoção das estruturas do fungo com auxílio de uma escova de cerdas macias e posterior filtragem em gaze com camada dupla. A concentração do inóculo foi determinada em hemacitômetro (Câmara de Neubauer) e ajustada para aproximadamente 1×10^5 conídios/ml. A suspensão foi adicionado Tween 80 (polioxyethylene sorbitan monoleate, Atlas Chemical Industries Inc.), na concentração de 0,05%.

b) *Pseudomonas* spp. Fluorescentes

Em condições assépticas, células dos isolados bacterianos com 48 horas de incubação em meio NYDA (3 g de extrato de carne; 5 g de bactopectona; 10 g de dextrose; 5 g de extrato de levedura; 18 g de ágar; 1000 ml de água destilada), foram transferidas para tubos de ensaio com 10 ml de água destilada esterilizada, sofrendo em seguida, agitação mecânica por 1 minuto e filtragem em gaze com camada dupla. A concentração das suspensões foi determinada através de leitura em fotocolorímetro (580 nm) e ajustada para 35% de transmitância, aproximadamente 1×10^8 células/ml. Em cada suspensão foi adicionado Tween 80 na concentração de 0,05%.

2.1.2. Inoculação

Plantas de inhame, cv. cará-da-costa, com quatro meses de idade, cultivadas em condições de casa-de-vegetação, foram inoculadas com *C. eragrostidis* e tratadas com os isolados *Pseudomonas* spp. fluorescentes, por aspersão da parte aérea com

atomizador De Vilbiss no. 15, nas concentrações mencionadas anteriormente. A testemunha consistiu da inoculação do fitopatógeno, sem o respectivo tratamento com o candidato antagonista. Após esses procedimentos as folhas foram mantidas em câmara umida, sob condições naturais de fotoperíodo, por 36 horas.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, cujos tratamentos representam 50 isolados bacterianos, com quatro repetições.

A avaliação foi efetuada aos 12 dias de inoculação, analisando-se os sintomas da doença e atribuindo-se notas de 0 a 4 (0 = ausência de sintomas; 1 = presença de pequeno número de lesões circulares ou irregulares, isoladas; 2 = presença de lesões circulares ou irregulares isoladas, com até 20% da área foliar afetada; 3 = grande número de lesões e com alguma confluência, de 20 a 40% da área foliar afetada; 4 = lesões abundantes, confluentes, com mais de 40% da área foliar afetada) para cada folha separadamente, obtendo-se assim a média de duas folhas por repetição. Com os dados obtidos, calculou-se a porcentagem de redução da severidade da doença [RSD (%)], empregando-se a fórmula:

$$RSD (\%) = [(SDTe - SDTr) / SDTe] \times 100$$

onde: SDTe = severidade da doença na testemunha

SDTr = severidade da doença no tratamento.

Durante o período de execução do experimento, a

temperatura na casa-de-vegetação foi de $30,5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa média de 88%.

2.2. Influência do Período de Aplicação de *Pseudomonas* spp. Fluorescentes no Biocontrole da Queima-das-Folhas do Inhame

Visando avaliar a influência do período de aplicação dos nove isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes (CR-1, CR-3, FR-8, FR-12, FR-53, TR-2, TR-24, TR-30) que demonstraram previamente maior potencial no controle da queima das folhas, plantas de inhame, cv. cará-da-costa, com cinco meses de idade e mantidas sob condições de casa-de-vegetação, foram inoculadas com *C. eragrostidis* (2×10^5 conídios/ml) e tratadas com as bactérias (1×10^8 células/ml). Como tratamento padrão empregou-se o fungicida comercial Manzate BR (mancozeb, 800 g p.a./kg, Du Pont do Brasil S.A.), na concentração de 2000 ppm do produto comercial.

Os antagonistas e o fungicida foram aplicados por aspersão da parte aérea, até o ponto de molhamento, em três diferentes períodos, em relação ao momento de inoculação do fitopatógeno: a) três dias antes; b) no mesmo dia; c) três dias depois. As plantas testemunhas receberam somente a suspensão do fitopatógeno contendo Tween 80. Imediatamente após as aplicações dos antagonistas e inoculação do fitopatógeno, as folhas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 36 horas.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 10x3, cujos fatores representam respectivamente, nove isolados bacterianos mais o fungicida, e três períodos de aplicação, com quatro repetições.

A avaliação foi efetuada da mesma maneira descrita em 2.1.

Durante o período de execução do experimento a temperatura na casa-de-vegetação foi de $29,2 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa média de 90%.

2.3. Análise das Interações Antagônicas entre *Pseudomonas* spp. Fluorescentes e *Curvularia eragrostidis* em Condições de Laboratório

Com o objetivo de analisar as interações antagônicas entre *C. eragrostidis* e os nove isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, previamente selecionados como agentes potenciais de biocontrole da queima das folhas do inhame, foram empregados os métodos da cultura pareada, papel celofane e germinação de conídios em lâmina.

2.3.1. Método da Cultura Pareada

Visando a observação de possíveis interações antagônicas que envolvam competição por nutrientes e/ou antibiose entre *Pseudomonas* spp. fluorescentes e *C. eragrostidis*, foi

utilizado o método da cultura pareada.

Dois discos de 5 mm de diâmetro removidos de colônias ativas de *C. eragrostidis* foram colocados, equidistantes de 7 cm, em uma placa de Petri, contendo meio BDA ou KMB (20 g de bactopectona; 8,7 ml de glicerol; 1,5 g de $MgSO_4$; 1,5 g de $K_2H_2PO_4 \cdot 7H_2O$; 17 g de ágar; 1000 ml de água destilada). Após 24 horas de incubação, as bactérias foram inoculadas com uma risca central entre os dois discos, exceto na testemunha. As placas foram incubadas à temperatura de $25 \pm 2^\circ C$ e umidade relativa de $62 \pm 5 \%$, em regime de alternância luminosa (12 horas claro/12 horas/escuro).

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 9×2 , cujos fatores representam respectivamente, nove isolados bacteriano e dois meios de cultura, com seis repetições.

A avaliação foi realizada aos 4 e 7 dias de incubação, respectivamente para os meios BDA e KMB, através da medição do crescimento micelial linear do fitopatógeno, obtendo-se a média por placa. Com os dados obtidos calculou-se a porcentagem de inibição de crescimento micelial, empregando-se a fórmula descrita por EDINGTON, KHEW & BARRON (1971).

2.3.2. Método do Papel Celofane

Com o objetivo de avaliar a influência de metabólitos extracelulares sintetizados por *Pseudomonas* spp. fluorescentes sobre o crescimento micelial de *C. eragrostidis*, foi utilizado o

metodo do papel celofane descrito por GIBBS (1967).

Para o centro de placas de Petri, contendo meio BDA ou KMB sobreposto por papel celofane esterilizado, foram transferidos, individualmente, crescimentos bacterianos em quantidade equivalendo um "loopfull" da alça de platina. Após cinco dias de incubação, efetuou-se a retirada do papel celofane com o crescimento bacteriano aderente, sendo transferido um disco de 5 mm de diâmetro de *C. eragrostidis* para o centro de cada placa. A testemunha consistiu do cultivo do fitopatógeno após a retirada do celofane, sem a prévia sobreposição pelo antagonista.

As condições de incubação e o delineamento estatístico foram semelhantes ao descrito em 2.3.1.

A avaliação foi realizada aos 7 e 10 dias de incubação, respectivamente para os meios BDA e KMB; através da medição do diâmetro da colônia do fitopatógeno. Com os dados obtidos determinou-se a porcentagem de inibição do crescimento micelial, conforme citado em 2.3.1.

2.3.3. Método da Germinação de Conídios em Lâmina Escavada

Visando avaliar a influência de *Pseudomonas* spp. fluorescentes sobre a germinação dos conídios de *C. eragrostidis*, foi utilizado o método do pareamento de suspensões em lâmina escavada.

Cerca de 0,2 ml de cada suspensão bacteriana (1×10^8 células/ml) foi depositada sobre igual volume da suspensão de

conídios do fitopatógeno (2×10^5 conídios/ml) em lâminas escavadas. Como tratamento padrão empregou-se o fungigida Manzate BR (2000 ppm) sobre a suspensão de conídios do fitopatógeno. A testemunha caracterizou-se pela deposição de 0,2 ml de água destilada esterilizada sobre a suspensão de conídios. As lâminas foram colocadas em câmara úmida e incubadas à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com quatro repetições.

A avaliação foi efetuada após seis horas de incubação, sendo depositada uma gota de azul de Aman em cada cavidade da lâmina escavada, e procedendo-se à contagem do número de conídios germinados e não germinados, sob aumento de 100x, em microscópio ótico. Como conídio germinado considerou-se aquele que apresentava o comprimento do tubo germinativo com, no mínimo, duas vezes a sua maior largura. Para efeito de cálculo, foi efetuada a média da leitura em três campos microscópicos por repetição, determinando-se a porcentagem de inibição da germinação dos conídios, através da fórmula adaptada de EDINGTON, KHEW & BARRON (1971).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na seleção preliminar de isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes com potencial antagônico sobre *Curvularia eragrostidis* em plantas de inhame, foram verificadas reduções na severidade da queima-das-folhas entre 92,86 e 11,31% (Tabela 1). Dentre os 50 isolados testados, nove proporcionaram mais de 75% de redução na severidade da doença, os quais foram selecionados como agentes potenciais de biocontrole, destacando-se o isolado TR-24 com 92,86%, seguido de TR-2 e TR-30, ambos com 89,29%. Por outro lado, apenas sete isolados demonstraram eficiência menor que 30%.

Considerando que os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes utilizados nesse estudo foram obtidos do rizoplano de várias culturas, estes resultados revelam a possibilidade do emprego de microrganismos não residentes do filoplano como agentes potenciais de biocontrole de patógenos na parte aérea, confirmando as observações de BETTIOL (1991b), de que microrganismos ocorrentes em outros habitats podem ser utilizados com sucesso no filoplano, tendo como vantagem abreviar o período de seleção de antagonistas nas fases iniciais do trabalho. Resultados semelhantes têm sido obtidos por vários pesquisadores. BAKER et al. (1983) verificaram que um isolado de *Bacillus subtilis*, originário do solo, reduziu em 95% o número de

pústulas em folhas de feijoeiro sob condições de casa-de-vegetação, quando aplicado em cultura líquida de 2 a 120 horas antes da inoculação de uredinosporos de *Uromyces phaseoli*. Em condições de campo, BAKER et al. (1985) observaram redução de no mínimo 75% na ocorrência de ferrugem no feijoeiro, com três aplicações semanais de *B. subtilis*. LEVY & EYAL (1988), utilizando isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes obtidos a partir de solo israelense, constataram destacada supressão no desenvolvimento de *Septoria tritici* no filoplano das cultivares de trigo Bezostaya 1e Lakhish, mantidas em condições de casa-de-vegetação. Em cultivares de primavera, usando os mesmos agentes de biocontrole, esses autores verificaram uma significativa redução no número de pústulas de *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*.

Os nove isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, previamente selecionados como mais promissores, quando aplicados a diferentes períodos em relação ao momento de inoculação de *C. eragrostidis*, evidenciaram eficiência variável no controle da queima-das-folhas do inhame (Tabela 2). Embora tenha sido utilizada o dobro da concentração de inóculo da seleção preliminar, considerando a média dos diferentes períodos de aplicação, TR-24 destacou-se entre os isolados bacterianos, propiciando uma redução de 47,92% na severidade da doença, que embora inferior ao nível obtido pela aplicação de mancozeb (59,38%), não diferiu significativamente deste. Diferença significativa foi constatada entre os períodos de aplicação, sendo que maiores níveis de controle foram obtidos quando os

isolados bacterianos e o fungicida foram aplicados três dias antes da inoculação de *C. eragrostidis*. Considerando a interação entre tratamentos e períodos de aplicação, o isolado TR-24 apresentou alta eficiência quando aplicado aos três dias antes da inoculação de *C. eragrostidis*, propiciando redução de 75% na severidade da queima das folhas, embora sem diferir significativamente dos isolados CR-1 e FR-4, e sendo superado apenas pela aplicação de mancozeb no mesmo dia da inoculação do fitopatógeno. Com a aplicação no mesmo dia da inoculação de *C. eragrostidis*, embora superior aos demais isolados, TR-24 reduziu pela metade a eficiência em relação a aplicação preventiva, ao contrário do obtido com a aplicação de mancozeb no mesmo período. Embora o efeito dos tratamentos tenha reduzido com a aplicação aos três dias após a inoculação do fitopatógeno, o isolado TR-24 propiciou nível de controle superior ao obtido com a aplicação de mancozeb, embora sem diferir significativamente.

A redução dos níveis de controle apresentado pelos isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes quando aplicados aos três dias após a inoculação de *C. eragrostidis*, evidenciam a pouca capacidade de colonização e competividades destes antagonistas após o estabelecimento do fitopatógeno, conforme observado por BOUDREAU & ANDREWS (1987) ao analisarem outros patossistemas.

Na análise das interações "in vitro" entre *C. eragrostidis* e os nove isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, através de teste em culturas pareadas,

considerando a média dos meios de cultura KMB e BDA, o isolado *FR-53* demonstrou maior antagonismo ao fitopatógeno, seguido de *FR-12* e *CR-3*, diferindo significativamente entre si e dos demais (Tabela 3). Por outro lado, nenhum efeito inibitório sobre o crescimento de *C. eragrostidis* foi evidenciado pelos isolados *TR-2*, *CR-1* e *FR-4*. Diferença significativa foi constatada entre os meios de cultura, destacando-se KMB ao proporcionar maior atividade antagônica dos isolados bacterianos, associada a intensa produção de pigmentos fluorescentes. Na interação entre meios de cultura e isolados bacterianos, maior antagonismo foi demonstrado pelo isolado *FR-12* no meio KMB, com 58,10% de inibição do crescimento de *C. eragrostidis*, seguido de *FR-53* no mesmo meio com 56,67%, sem diferirem significativamente entre si. O isolado *TR-24*, que evidenciou maior eficiência no controle da queima das folhas do inhame em condições de casa-de-vegetação, quando em cultura pareada com o fitopatógeno, apresentou efeito inibitório somente no meio KMB.

A inibição do crescimento micelial de *C. eragrostidis* indica a produção de metabólitos extracelulares não-voláteis com ação fungistática pelos isolados de *P. fluorescens*, semelhante ao constatado nas interações destes antagonistas com outros fitopatógenos (REDDY & PATRICK, 1991; THOMASHOW & WELLER, 1988). A variação observada entre os isolados bacterianos quanto a capacidade para inibir o fitopatógeno através de metabólitos extracelulares pode ter sido ocasionada pela variabilidade genética inerente a cada isolado e/ou por fatores externos, como equilíbrio nutricional e pH do meio, bem como condições

ambientais (ANDREWS, 1992a; FRAVEL, 1988). A participação de metabólitos extracelulares não-voláteis produzidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes no biocontrole de patógenos do filoplano tem sido pouco estudada, embora esses compostos tenham sido parcialmente responsabilizados pelo controle de *Drechslera dictyoides* em centeio (AUSTIN et al., 1976), bem como *Septoria tritici* e *Puccinia recondita* em trigo (LEVY et al., 1989).

A formação de pigmentos fluorescentes em meio KMB pelos isolados de *P. fluorescens*, indica a produção de sideróforos, que são compostos de baixo peso molecular e com alta afinidade por ferro (LEONG, 1986). Embora a participação de sideróforos na atividade de biocontrole de fitopatógenos habitantes do solo tenha sido comprovada (THOMASHOW, 1990), técnicas precisas para detecção desses compostos na superfície foliar ainda não existem (LINDOW, 1991). Além disso, a instabilidade de antibióticos e outros metabólitos secundários produzidos por microrganismos no filoplano é bastante comum, principalmente devido a fatores como adsorção, imobilização, oxidação ou diluição na superfície foliar, bem como repetidas condensações e evaporação de água (BLAKEMAN & BRODIE, 1976).

Os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, através do método do papel celofane nos meios KMB e BDA, demonstraram diferentes níveis de inibição do crescimento micelial de *C. eragrostidis* em decorrência da liberação de metabólitos extracelulares não-voláteis, com a média variando entre 84,74 e 0% (Tabela 4). Maior efeito inibitório foi demonstrado por

metabólitos produzidos pelo isolado CR-3, com média de 84,74%, seguido por FR-12 e FR-53, sem diferirem significativamente entre si. Nenhuma atividade antagônica foi evidenciada pelo isolado TR-30, embora sem diferir significativamente de TR-24, TR-2 e FR-4. Os meios de cultura não influenciaram significativamente a atividade antagonística dos isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes através da produção de metabólitos extracelulares. Na interação entre meios de cultura e isolados bacterianos, maior efeito inibitório foi apresentado pelos metabólitos produzidos por CR-3 no meio KMB (93,61%), seguido de FR-53 (86,66%) em BDA. O isolado TR-24 não evidenciou atividade antagônica em BDA, enquanto em KMB inibiu em apenas 1,36% o crescimento de *C. eragrostidis*.

A produção, pelos isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, de metabólitos extracelulares, não-voláteis e difusíveis, com atividade inibitória sobre *C. eragrostidis*, foi demonstrada pelo método do papel celofane, confirmando o envolvimento da antibiose como um dos mecanismos de antagonismo "in vitro". A variação observada entre os isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes quanto a capacidade de inibição do fitopatógeno por meio de metabólitos extracelulares não-voláteis, além da possível variabilidade genética inerente a cada isolado, considerando os relatos de CULLEN & ANDREWS (1984b), FRAVEL (1988) e ANDREWS (1992), pode ter sido ocasionada por fatores externos, como equilíbrio nutricional e pH do meio, bem como condições ambientais.

No teste em lâminas escavadas, após seis horas de

incubação em água destilada esterilizada e na ausência de células bacterianas ou fungicida, os conídios de *C. eragrostidis* apresentavam-se totalmente germinados. Com o pareamento das suspensões, a maioria dos isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes influenciaram na germinação dos conídios do fitopatógeno. Embora inferior ao obtido com o fungicida mancozeb, que inibiu totalmente a germinação dos conídios de *C. eragrostidis*, o isolado TR-24 demonstrou intensa atividade antagônica (94,83%), seguido de CR-3 e TR-2, que diferiram significativamente entre si e dos demais isolados. O isolado TR-30 não evidenciou qualquer efeito inibitório sobre a germinação dos conídios, do qual não diferiu significativamente o isolado CR-1, com apenas 0,04% (Tabela 5).

A rapidez com que os conídios de *C. eragrostidis* germinaram em água destilada esterilizada, indicam a pouca dependência deste fitopatógeno em relação a nutrientes exógenos para a formação de estruturas iniciais de infecção, apresentando-se portanto, conforme BLAKEMAN (1985), pouco sensível a antagonismo baseado em competição por nutrientes.

A atividade antagônica dos isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes sobre a germinação dos conídios do fitopatógeno pode estar associada à produção e difusão de metabólitos extracelulares não-voláteis, uma vez que, segundo BAKER & COOK (1983), este efeito é normalmente associado a antibiose, na qual os metabólitos podem inibir a germinação dos esporos do fitopatógeno através de ação letal, ou penetrar na célula e

inibir sua atividade por toxicidade química. O intenso efeito inibitório demonstrado pelo isolado TR-24 sobre a germinação dos conídios de *C. eragrostidis*, pode indicar um possível fator envolvido na eficiência do controle da queima das folhas do inhamo quando aplicado preventivamente em condições de casa-de-vegetação, uma vez que a germinação de esporos fúngicos sobre a superfície foliar é considerado um estágio crítico no desenvolvimento da interação patógeno-hospedeiro. Neste estágio, na maioria das vezes o patógeno é muito vulnerável e interações com outros microrganismos podem determinar o sucesso ou fracasso no processo de infecção (BLAKEMAN, 1982; DUBOS, 1987; CAMPBELL, 1989).

Em função dos resultados obtidos neste estudo, é pouco provável apenas um mecanismo esteja envolvido no antagonismo dos isolados de *P. fluorescens* sobre *C. eragrostidis*. Segundo ANDREWS (1992a), os mecanismos de biocontrole não são inteiramente exclusivos, uma vez que sua importância relativa pode variar com as condições ambientais e o estado de desenvolvimento do agente biocontrolador e do fitopatógeno.

A baixa correlação entre antagonismo *in vivo* e *in vitro*, nas interações entre *C. eragrostidis* e os isolados bacterianos, reforçam as afirmações de que resultados obtidos *in vitro* não devem ser usados como parâmetros para seleção de agentes de biocontrole, mas apenas como estimativas de antagonismo e/ou observação de possíveis mecanismos envolvidos (ANDREWS, 1992b).

O conjunto dos resultados evidenciaram o grande potencial do isolado TR-24 de *P. fluorescens* como agente de biocontrole da queima das folhas do inhame.

Tabela 1 - Influência da aplicação de *Pseudomonas* spp. fluorescentes na redução da severidade da queima das folhas do inhame (RSD %).

Isolado Bacteriano	RSD (%)	Isolado Bacteriano	RSD (%)
TR-24	92,86 a	CR-11	59,52 bcdefghi
TR-2	89,29 ab	TR-39	55,95 cdefghij
TR-30	89,29 ab	CR-15	55,26 cdefghij
FR-53	82,14 abc	CR-22	52,38 cdefghijk
CR-1	81,54 abc	FR-7	52,38 cdefghijk
CR-3	77,98 abcd	TR-29	52,38 cdefghijk
FR-4	77,98 abcd	CR-2	52,38 cdefghijk
FR-8	77,98 abcd	TR-48	51,79 cdefghijk
FR-12	77,97 abcd	TR-38	48,81 defghijk
TR-25	74,40 abcde	FR-50	48,22 defghijk
FR-9	74,40 abcde	TR-3	48,22 defghijk
CR-8	74,40 abcde	TR-18	45,24 efghijk
TR-27	74,40 abcde	TR-21	44,64 efghijk
TR-26	70,83 abcdef	TR-45	44,64 efghijk
FR-6	70,83 abcdef	TR-37	41,07 fghijkl
FR-5	70,83 abcdef	TR-43	37,50 ghijkl
FR-11	70,83 abcdef	TR-19	37,49 ghijkl
TR-40	66,67 abcdefg	CR-30	33,33 hijkl
TR-17	66,67 abcdefg	TR-50	29,76 ijkl
FR-18	66,67 abcdefg	TR-41	29,76 ijkl
FR-15	63,09 abcdefgh	TR-33	29,76 ijkl
FR-48	63,09 abcdefgh	FR-10	26,19 jkl
CR-27	63,09 abcdefgh	TR-49	22,02 kl
TR-34	60,12 bcdefghi	FR-49	22,02 kl
TR-8	59,52 bcdefghi	TR-54	11,31 l

DMS (5%) = 31,51

C.V. = 19,08%

Média de quatro repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 2 - Influência do período de aplicação de *Pseudomonas* spp. e mancozeb na redução da severidade da queima folhas do inhame (RSD %).

Tratamento	RSD (%) ¹	Período de Aplicação	RSD (%) ²	Tratamento x Período - RSD (%) ³			DMS (5%)	
				Tratamento	- 3	0		+ 3
Mancozeb	59,38 a	- 3	44,69 a	Mancozeb	68,75 aB	90,62 aA	18,75 abC	16,58
TR-24	47,92 a	0	26,88 b	TR-24	75,00 aA	37,50 bB	31,25 aB	16,58
FR-4	31,25 b	+ 3	11,25 c	FR-4	56,25 abA	31,25 bB	6,25 bC	16,58
FR-53	27,08 bc			FR-53	40,62 bcA	25,00 bcAB	15,62 abB	16,58
CR-1	27,08 bc			CR-1	71,88 aA	6,25 cB	3,12 bB	16,58
TR-2	22,92 bcd			TR-2	37,50 bcA	18,75 bcB	12,50 abB	16,58
TR-30	17,71 cd			TR-30	25,00 cA	18,75 bcA	9,38 abA	16,58
FR-8	16,67 cd			FR-8	25,00 cA	18,75 bcAB	6,25 bB	16,58
FR-12	14,58 cd			FR-12	25,00 cA	15,62 bcAB	3,12 bB	16,58
CR-3	11,46 d			CR-3	21,88 cA	6,25 cA	6,25 bA	16,58
DMS (5%)	13,01		5,24		22,54	22,54	22,54	
CV = 21,30%								

¹Média de 12 repetições.

²Média de 40 repetições.

³Média de 4 repetições.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúscula no sentido horizontal não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 3 - Influência de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis*, em culturas pareadas nos meios BDA e KMB.

Isolado Bacteriano	ICM (%) ¹	Meio	ICM (%) ²	Isolado x Meio - ICM (%) ³			DMS (5%)
				Isolado	KMB	BDA	
FR-53	50,24 a	KMB	31,80 a	FR-53	56,67 aA	43,81 aB	2,57
FR-12	46,43 b	BDA	11,69 b	FR-12	58,10 aA	34,76 bB	2,57
CR-3	39,05 c			CR-3	51,43 bA	26,66 cB	2,57
TR-30	22,38 d			TR-30	44,76 cA	0,00 dB	2,57
FR-8	21,19 d			FR-8	42,38 cA	0,00 dB	2,57
TR-24	16,43 e			TR-24	32,86 dA	0,00 dB	2,57
TR-2	0,00 f			TR-2	0,00 eA	0,00 dA	2,57
CR-1	0,00 f			CR-1	0,00 eA	0,00 dA	2,57
FR-4	0,00 f			FR-4	0,00 eA	0,00 dA	2,57
DMS (5%)	2,90		0,86		4,11	4,11	
C.V. = 10,30%							

¹Média de 12 repetições.

²Média de 54 repetições.

³Média de 6 repetições.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúscula no sentido horizontal não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 4 - Efeito de metabólitos extracelulares produzidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes sobre o crescimento micelial de *Curvularia eragrostidis*, nos meios BDA e KMB.

Isolado Bacteriano	ICM (%) ¹	Meio	ICM (%) ²	Isolado x Meio - ICM (%) ³			DMS (5%)
				Isolado	KMB	BDA	
CR-3	84,74 a	KMB	33,81 a	CR-3	93,61 aA	75,87 abB	15,30
FR-12	76,59 a	BDA	33,43 a	FR-12	80,40 abA	72,78 abA	15,30
FR-53	74,42 a			FR-53	62,18 bB	86,66 aA	15,30
FR-8	36,81 b			FR-8	58,90 bA	14,72 cB	15,30
CR-1	27,50 b			CR-1	4,17 cB	50,83 bA	15,30
FR-4	1,14 c			FR-4	2,27 cA	0,00 cA	15,30
TR-2	0,68 c			TR-2	1,36 cA	0,00 cA	15,30
TR-24	0,68 c			TR-24	1,36 cA	0,00 cA	15,30
TR-30	0,00 c			TR-30	0,00 cA	0,00 cA	15,30
DMS (5%)	17,44		5,10		24,67	24,67	
C.V. = 32,07%							

¹Média de 8 repetições.

²Média de 36 repetições.

³Média de 4 repetições.

Médias seguidas pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúscula no sentido horizontal não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 5 - Influência de *Pseudomonas* spp. fluorescentes e mancozeb na germinação de conídios de *Curvularia eragrostidis*.

Tratamento	Inibicao da Geminacao (%)
<i>Mancozeb</i>	100,00 a
TR-24	94,83 b
CR-3	84,21 c
TR-2	80,86 c
FR-12	51,67 d
FR-53	16,31 e
FR-4	5,18 f
FR-8	4,89 f
CR-1	0,04 g
TR-30	0,00 g
DMS (5%)	4,77
C.V. = 4,51	

Média de 4 repetições. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

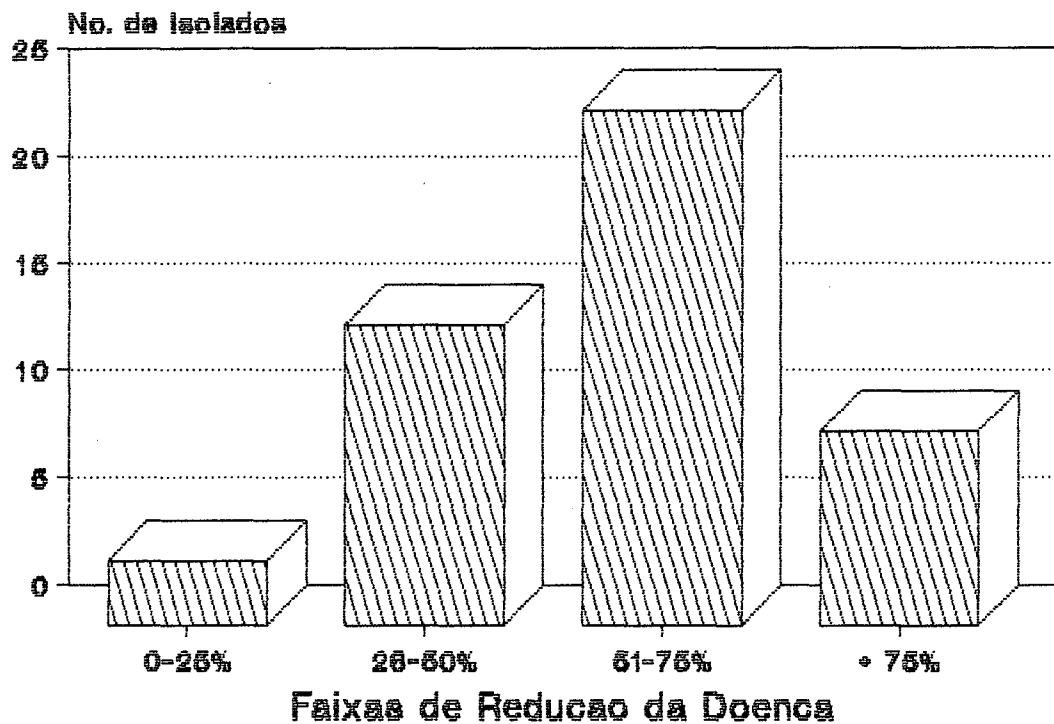


Figura 1 - Faixas de redução da severidade da queima-das-folhas do inhame apresentadas por isolados de *Pseudomonas* spp. fluorescentes

4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J. & MIMS, C.W. **Introductory mycology**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. 632 p.
- ANDREWS, J.H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 603-635, 1992a.
- ANDREWS, J.H. The screening of microorganisms antagonistic to phytopathogens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 165-174, 1992b
- ANDREWS, J.H. Strategies for selecting antagonistic microorganisms from the phylloplane. In: WINDELS, C.E. & LINDOW, S.E. (Eds.). **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p. 31-44.
- AUSTIN, B.; DICKINSON, C.H. & GOODFELLOW, M. Antagonistic interactions of phylloplane bacteria with **Drechslera dictyoides** (Drechsler) Shoemaker. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 23, p. 710-715, 1977.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R. & MOCK, N. Biological control of bean rust by **Bacillus subtilis** under field conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v. 69, n. 9, p. 770-772, 1985.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; 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, v. 73, n. 8, p. 1148-1152, 1983.

- BETTIOL, W. Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**, Jaquariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991a. p. 1-5. (EMBRAPA-CNPDA. DOCUMENTOS, 15).
- BLAKEMAN, J.P. & BRODIE, I.D.S. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. In: DICKINSON, C.H. & FREECE, T.F. (Eds.). **Microbiology of aerial plant surfaces**. London: Academic Press, 1976. p. 529-557.
- BLAKEMAN, J.P. & FOKKEMA, N.J. Potencial for biological control of plant diseases on the phylloplane. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 20, p. 167-192, 1982.
- COOK, R.J. & BAKER, K.F. **Nature and practice of biological control of plant pathogens**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1983. 539 p.
- EDINGTON, L.V.; KHEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.
- FAO. **Yearbook production**. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations, 1990. v. 43. 346 p. (FAO. Statistics Series, 94).
- FRAVEL, D.R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p. 75-91, 1988.

- FRAVEL, D.R.; SPURR, H.W., JR. Biocontrol of tobacco brown spot disease by *Bacillus subtilis* subsp. *mycoides* in a controlled environment. *Phytopathology*, St. Paul, v. 67, p. 930-932, 1977.
- FOKKEMA, N.J.; VAN DER MEULEN, F. Antagonism of yeast like phyllosphere fung against *Septoria nodorum* on wheat leaves. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, Wageningen, v.82, p.13-16, 1976.
- GIBBS, J.N. A study of the epiphytic growth habit of *Fomes annosus*. *Annals of Botany*, London, v. 31, n. 124, p. 755-774, 1967.
- KNUDSEN, G.R. & SPURR, H.W., JR. Management of bacterial populations for foliar disease biocontrol. In: MUKERJI, K.G. & GARG, K.L. (Eds.). *Biocontrol of plant diseases*. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, p. 83-92.
- KNUDSEN, G.R. & SPURR, H.W., JR. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. *Plant Disease*, St. Paul, v. 71, n. 5, p. 442-445, 1987.
- LEONG, J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.24, p.187-209, 1986.
- LEVY, E.; EYAL, Z. Suppression of *Septoria tritici*. Blotch and leaf rust on wheat seedling leaves by Pseudomonads. *Plant pathology*, London, v. 37, p. 551-557, 1988.

- LEVY, E.; EYAL, Z.; CARMELY, S.; KASHMAN, Y. & CHET, I.
Suppression of *Septoria tritici* and *Puccinia recondita* of
wheat by an antibiotic producing fluorescent pseudomonad.
Plant Pathology, London, v.38, p.564-570, 1989.
- LOPES, C.A. Biological control of *Pseudomonas avenae* with
epiphytic bacteria isolated from corn plants. Gainesville,
1986. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - University of
Florida. 102 p.
- MAFRA, R.C. *Recomendações técnicas para o cultivo do cará*.
Brasília: EMBRAPA-CNPQ, 1986. 15 p. (mimeografado).
- MEDEIROS, A.G. & AQUINO, M.L.N. Ocorrência de *Curvularia maculans*
(Bancroft) Boedijn var. *macrospora*, nova variedade, em folhas
de cara (*Dioscoreaceae*) no Estado de Pernambuco. *Boletim
Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas*, Recife, v. 7,
p. 1-8, 1964.
- MOURA, R.M. Doenças do inhame, *Dioscoreacea cayennensis* Lam. var.
rotundata Poir. 1990. 11 p. (mimeografado)
- MOURA, R.M. & MOURA, A.M. Ocorrência da pratilencose do inhame no
Estado da Paraíba. *Nematologia Brasileira*, Piracicaba, v. 13,
p. 51-58, 1989.
- RAMOS, J.E.L. Estudos sobre a etiologia da queima das folhas do
inhame (*Dioscorea cayennensis* Lam.) e teste de eficiência dos
produtos mancozeb e iprodione no controle da doença. Recife,
1991. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade
Federal Rural de Pernambuco. 103 p.

REDDY, M.S. & PATRICK, Z.A. Effect of a fluorescent pseudomonads on growth of tobacco seedlings and suppression of black root rot caused by *Thielaviopsis basicola*. WPRS Bulletin, Interlaken, v.14, n.8, p.23-29, 1991.

RISHBETH, F.R.S. Biological control of air-borne pathogens. *Philosophical Transactions of the Royal Society Of London*, London, v. B 318, p. 265-281, 1988.

ROBBS, C.F. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W (Org.). *Controle biológico de doenças de plantas*. Jaquariúna: EMBRAPA-CNPDA, 1991. p. 121-134. (EMBRAPA-CNPDA. Documentos, 15).

SCHROTH, M.N.; LOPER, J.E. & HILDEBRAND, D.C. Bacteria as biological control agent of plant disease. In: KLUG, M.J. & REDDY, C.A. (Eds.). *Current perspectives in microbial ecology*. Washington: American Society of Microbiology, 1984. p. 362-369.

SILVA, A.A. de. *Cultura do cara da costa*. Fortaleza: Banco do Nordeste, 1971. 66 p.

SISTEMA de producao para cara da costa: Agreste Setentrional, Agreste Meridional e Mata Norte. Recife: EMATER/IFA, 1985. 48 p. (Serie Sistema de Producao . Boletim, 11).

SPENCER, D.M. Parasitism of carnation rust (*Uromyces dianthi*) by *Verticillium lecanii*. *Transactions of the British Mycological Society*, London, v. 74, n. 1, p. 191-194, 1980.

- SPURR, H.W., JR. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonists. In: BLAKEMAN, J.P. (Eds.). **Microbial ecology of the phylloplane**. London: Academic Press, 1981. p. 369-382.
- SPURR, H.W., JR. & KNUDSEN, G.R. Biological control of leaf diseases with bacteria. In: WINDELS, C.E. & LINDOW, S.E. (Eds.). **Biological control on the phylloplane**. St. Paul: The American Phytopathological Society, 1985. p. 45-62.
- SUDO, S. Biocontrole de *Catacauma torrendiela* e *Coccostroma palmicola*, agentes causadores de lixa-preta no coqueiro. In: **Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas**, 3, 1989. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba. USP/EMBRAPA, 1989. p. 57-59.
- SUNDHEIM, L.; AMUNDSEN, T. Fungicide tolerance in the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and integrated control cucumber powdery mildew. **Acta Agriculturae Scandinavica**. Stockholm, v. 32, p. 349-355, 1982.
- THOMASHOW, L.S. Molecular basis of antibiosis mediated by rhizosphere pseudomonads. **WPRS Bulletin**, Interlaken, v.14, n.8, p.109-114, 1991.
- THOMASHOW, L.S. & WELLER, D.M. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p.3499-3508, 1988.

VEIGA, A.F.S.L. Contribuição ao conhecimento das pragas do cará da costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.) e seu controle no Estado de Pernambuco. *Boletim Técnico do Instituto de Pesquisas Agronômicas*, Recife, v. 69, p. 1-38, 1974.

VEIGA, A.F.S.L.; MOURA, R.M. & SENA, R.C. Aspectos fitossanitários do cará-inhame, variedade da costa (*Dioscorea cayennensis* Lam.), no Nordeste do Brasil. Recife: IPA/ANCARPE, 1971. 19 p. (Articulação Pesquisa-Extensão, 8).

VIDAVER, A.K. Biological control of plant pathogens with prokaryotes. In: MOUNT, M.S. & LACY, G.H. (Eds.). *Phytopathogenic Prokariotes*. New York: Academic Press, 1982. v. 1, p. 387-397.

PARTE II - ATIVIDADES COMPLEMENTARES

- FITOBACTERIOLOGIA
- FUNGOS FITOPATOGENICOS

1. INTRODUÇÃO

No seguimento normal do estágio foram desenvolvidas atividades complementares visando a necessária capacitação em princípios e métodos de Fitopatologia, envolvendo as áreas de Fitobacteriologia e Fungos Fitopatogênicos, as quais são listadas a seguir.

2. FITOBACTERIOLOGIA

2.1. Organização do Laboratório de Fitobacteriologia:

- Operação de equipamentos de microscopia e esterilização.
- Limpeza e esterilização de materiais.
- Identificação e manuseio de vidrarias, drogas e corantes, câmara e sala asséptica.

2.2. Coleta e preservação de material para exame laboratorial:

- Coleta de couve e repolho com podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)
- Coleta de beringela com murcha bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*).

2.3. Métodos de detecção rápida de bactérias fitopatogênicas:

- Método do copo para detecção de *Pseudomonas solanacearum* em plantas de beringela.
- Método da lâmina para detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em folhas de repolho.

2.4. Isolamento de bactérias fitopatogênicas:

- Isolamento de *Pseudomonas solanacearum* de plantas de beringela apresentando sintomas de murcha.
- Isolamento de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* de folhas de couve e repolho apresentando sintomas de podridão mole.
- Isolamento de *Erwinia carotovora* de frutos de pimentão apresentando sintomas de podridão mole.

2.5. Isolamento de rizobactérias do grupo fluorescentes:

- Isolamento de rizobactérias fluorescentes de feijão e tomate.

2.6. Caracterização de bactérias fitopatogênicas e antagonistas:

- Coloração de Gram.
- Teste de hipersensibilidade em fumo de rizobactérias fluorescentes.
- Teste de atividade pectinolítica de rizobactérias fluorescentes em tubérculos de batata.

2.7. *Técnicas de preservação de bactérias fitopatogênicas e antagonistas:*

- Preservação em água destilada esterilizada.
- Preservação em óleo mineral.
- Preservação em fitas de papel de filtro.
- Repicagens sucessivas.

2.8. *Preparo de meios de cultura de uso rotineiro em Fitobacteriologia:*

- Meio ágar-nutriente (AN).
- Meio ágar-nutriente-dextrose-extrato de levedura (NYDA).
- Meio B de King (KMB).

2.9. *Determinação da concentração de bactérias fitopatogênicas e biocontroladoras:*

- Escala de MacFarland.
- Densidade ótica em fotocolorímetro.

2.10. *Inoculação de bactérias fitopatogênicas:*

- Inoculação de *Agrobacterium tumefaciens* em coirana através de picada no colo.
- Inoculação de *Pseudomonas solanacearum* por infestação de solo e plantio de tomate.
- Inoculação de *Pseudomonas solanacearum* em beringela e pimentão através do ferimento das raízes.

2.11. Aplicação de bactérias antagonistas:

- Bacterização de sementes de feijão (cv. IPA-6) com *Pseudomonas* spp. fluorescentes e *Bacillus subtilis*, visando o controle de *Rhizoctonia solani*.
- Aplicação de *Bacillus subtilis* no filoplano de milho visando o controle de *Helminthosporium turcicum*.

3. FUNGOS FITOPATOGENICOS

3.1. Coleta e preservação de material para exame:

- Visita a propriedades rurais em Mamanguape (PB) para coleta de folhas de inhame infectadas por *Curvularia eragrostidis*.
- Visita à Estação Experimental da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - IPA, em Vitória de Santo Antão, para coleta de alface com cercosporiose (*Cercospora longissima*), cebola com mal-de-sete-voltas (*Colletotrichum circinans*), beterraba com cercosporiose, (*Cercospora beticola*), pimentão com alternariose (*Alternaria solani*), antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) e murcha (*Sclerotium rolfsii*).
- Coleta de material vegetal em horta e pomares da Universidade Federal Rural de Pernambuco: manga com mancha de *Stigmina* (*Stigmina mangiferae*) e antracnose

(*Colletotrichum gloeosporioides*); coqueiro com lixa (*Coccostroma palmicola* e *Coccostroma torrendiela*); tiririca com carvão (*Ustilago* sp.); batata-doce com ferrugem branca (*Albugo ipomoeae-panduranae*); mamoeiro com oídio (*Oidium* spp.); sorgo com antracnose (*Colletotrichum graminicola*).

3.2. *Visualização de estruturas de fungos fitopatogênicos e antagonistas, a partir de culturas puras e material vegetal:*

- Fungos visualizados a partir de material vegetal:
Albugo ipomoeae-panduranae, *Alternaria solani*, *Cercospora beticola*, *Coccostroma* spp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Curvularia eragrostidis*, *Helminthosporium turcicum*, *Oidium* sp., *Ustilago* sp.
- Fungos visualizados a partir de culturas puras:
Aspergillus flavus, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Curvularia eragrostidis*, *Fusarium oxysporum*, *Helminthosporium turcicum*, *Penicillium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Trichoderma* spp.

3.3. *Técnicas de preservação de fungos:*

- Preservação em água destilada esterilizada.
- Repicagens sucessivas.

3.4. *Germinação de esporos fúngicos em lâmina escavada:*

- Germinação de *Curvularia eragrostidis*.
- Germinação de *Helminthosporium turcicum*.
- Germinação de *Trichoderma* spp.

3.5. *Determinação da concentração de fungos fitopatogênicos e antagonistas:*

- Determinação da concentração de esporos de *Curvularia eragrostidis*, *Helminthosporium turcicum* e *Trichoderma* spp. em hemacitômetro (Camara de Neubauer).
- Determinação da concentração de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* em substrato colonizado (arroz autoclavado).

3.6. *Isolamento de fungos fitopatogênicos e antagonistas:*

- Isolamento de *Curvularia eragrostidis* e *Colletotrichum gloeosporioides* de folhas de inhame.
- Isolamento de *Sclerotium rolfsii* a partir de estruturas de resistência no solo e restos culturais de pimentão.
- Isolamento de *Trichoderma* spp. de amostras de solo.

3.7. *Métodos de inoculação de fungos fitopatogênicos:*

- Inoculação de *Helminthosporium turcicum* em milho através da aspersão de folhas.

- Inoculação de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* em plantas de tomate através do ferimento de raízes.
- Inoculação de *Rhizoctonia solani* em feijão através da infestação do solo com arroz colonizado.

3.8. Métodos de inoculação de fungos antagonistas:

- Incorporação de *Trichoderma* spp. em solo, através de substrato colonizado (farelo de trigo), visando o biocontrole de *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* em feijão.
- Tratamento de sementes de feijão com suspensão de esporos de *Trichoderma* spp., visando o biocontrole de *Rhizoctonia solani*.

3.9. Métodos de avaliação de danos devido a fungos fitopatogênicos:

- Avaliação da severidade da queima das folhas do inhame, causada por *Curvularia eragrostidis*.
- Avaliação da severidade da queima das folhas do milho, causada por *Helminthosporium turcicum*.
- Avaliação da severidade de tombamentos em plântulas de feijão, causados por *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*.

3.10. Outras atividades:

- Participação na montagem de experimentos sob condições de casa-de-vegetação (UFRPE, Recife) e

campo (IPA, Vitória de Santo Antão), visando a seleção de isolados de *Trichoderma* spp. com potencial antagônico sobre *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii* na cultura de feijão (cv. IPA-6).

Revisado por R. Manauá
Recife 03/94