

**BACTÉRIAS ENDOSPOROGÊNICAS NO  
MANEJO DE DOENÇAS DO ALGODOEIRO**

**HENRIQUE MONTEIRO FERRO**

**2009**

**HENRIQUE MONTEIRO FERRO**

**BACTÉRIAS ENDOSPOROGÊNICAS NO MANEJO DE DOENÇAS DO  
ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de  
Lavras, como parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do  
título de “Mestre”.

Orientador  
Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Ferro, Henrique Monteiro.

Bactérias endosporogênicas no manejo de doenças do algodoeiro  
/ Henrique Monteiro Ferro. – Lavras : UFLA, 2009.  
122 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.  
Orientador: Ricardo Magela de Souza.  
Bibliografia.

1. *Gossypium hirsutum*. 2. Biocontrole. 3. *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. 4. *Sclerotinia sclerotiorum*. 5. *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. 6. *Bacillus subtilis*. 7. *Paenibacillus lentimorbus*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.51996

**HENRIQUE MONTEIRO FERRO**

**BACTÉRIAS ENDOSPOROGÊNICAS NO MANEJO DE DOENÇAS DO  
ALGODOEIRO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 1º de outubro de 2009

Prof. Dr. Vicente Paulo Campos UFLA

Prof. Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes UFLA

Prof. Dr. Eduardo Alves UFLA

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Osvaldo Monteiro e Maria Edith, pela constante fonte de amor, carinho e incentivo na minha vida. Aos irmãos Hebert e Ellen, pela amizade e companheirismo

**OFEREÇO**

A meu avô Isidoro Ferro, pela fonte de alegria, força e sabedoria

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me guiado na vida e nos estudos, permitindo que chegasse até aqui, na conclusão do mestrado em Fitopatologia/Agronomia.

À Universidade Federal de Lavras, pela minha formação, principalmente ao Departamento de Fitopatologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Ricardo Magela de Souza, pela orientação na realização deste trabalho, confiança, amizade e oportunidade de trabalhar, desde a iniciação científica.

Aos professores que participaram da banca de avaliação, Dr. Vicente Paulo Campos, Dr. Luiz Antônio Augusto Gomes e Dr. Eduardo Alves, pelas valiosas sugestões.

Ao doutorando Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, pela amizade, confiança e valiosa contribuição para realização deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas: Helon, Edgar e Samuel, que foram indispensáveis na realização deste trabalho. Flávia, Ana Beatriz, Gustavo e Roberto pela colaboração, direta ou indireta, no desenvolvimento deste trabalho.

À laboratorista Ana Maria, pela amizade, além das dicas e ensino das técnicas de laboratório.

Ao Laboratório de Biocontrole Farroupilha, em especial ao Dr. Alan Pomella pela coorientação. Agnaldo e Robson, na ajuda nos ensaios de campo.

À empresa Sementes Farroupilha, em especial aos funcionários da Fazenda Farroupilha: Ronaldo, Eli e Saulo, sempre prestativos e indispensáveis à realização dos experimentos de campo.

Ao grande amigo Pedro, companheiro de república há muitos anos, que sempre com muita alegria e diversão nos entusiasma no dia-a-dia.

Enfim, a todos os amigos, familiares, professores que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

***Obrigado!***

## SUMÁRIO

|   | <b>Página</b> |
|---|---------------|
| RESUMO GERAL .....  | i             |
| GENERAL ABSTRACT .....  | ii            |
| INTRODUÇÃO GERAL.....   | 01            |
| Referências Bibliográficas.....   | 10            |
| CAPÍTULO 1: Bactérias endosporogênicas no controle da ramulose e<br>mancha-angular do algodoeiro.....         | 16            |
| 1 Resumo .....  | 17            |
| 2 Abstract.....   | 18            |
| 3 Introdução .....  | 19            |
| 4 Material e Métodos .....  | 23            |
| 4.1 Origem, preservação e produção de inóculo .....   | 23            |
| 4.2 <i>Bacillus</i> spp. no controle da ramulose e mancha-angular sob condições<br>de casa de vegetação ..... | 24            |
| 4.3 <i>Bacillus</i> spp. no controle da ramulose sob condições de campo .....                                 | 26            |
| 5 Resultados.....   | 30            |
| 5.1 Controle da ramulose do algodoeiro em casa de vegetação.....  | 30            |
| 5.2 Efeito das combinações dos isolados no controle da ramulose em casa<br>de vegetação.....                  | 32            |
| 5.3 Controle da mancha-angular do algodoeiro em casa-de-vegetação .....                                       | 33            |
| 5.4 Controle da ramulose em campo de produção de algodão.....   | 35            |
| 5.5 Produtividade e qualidade de fibras.....  | 37            |
| 6 Discussão .....   | 40            |
| 7 Conclusões.....   | 48            |
| 8 Referências Bibliográficas.....   | 49            |



|   |    |
|---|----|
| CAPÍTULO 2: Controle de mofo-branco, mancha-de-alternária e podridão-das-maçãs por bactérias endosporogênicas em campo comercial de produção de algodão ..... | 56 |
| 1 Resumo .....  | 57 |
| 2 Abstract.....   | 58 |
| 3 Introdução .....  | 59 |
| 4 Material e Métodos .....  | 62 |
| 4.1 Origem, preservação e produção dos inóculos de <i>Bacillus</i> spp. ....  | 62 |
| 4.2 <i>Bacillus</i> spp. no controle do mofo-branco, mancha-de-alternária e podridão-das maçãs do algodoeiro em condições de campo .....                      | 62 |
| 5 Resultados.....   | 66 |
| 5.1 Controle do mofo-branco em campo de produção de algodão .....   | 66 |
| 5.2 Controle da podridão-das maçãs em campo de produção de algodão.....   | 67 |
| 5.3 Controle da mancha-de-alternária em campo de produção de algodão ...  | 69 |
| 6 Discussão .....   | 71 |
| 7 Conclusões.....   | 74 |
| 8 Referências Bibliográficas.....   | 75 |
| CAPÍTULO 3: Métodos de aplicação de bactérias endosporogênicas no controle da ramulose, mancha-angular e podridão-das maçãs do algodoeiro                     | 79 |
| 1 Resumo .....  | 80 |
| 2 Abstract.....   | 81 |
| 3 Introdução .....  | 82 |
| 4 Material e Métodos .....  | 85 |
| 4.1 Origem, preservação e produção de inóculo.....  | 85 |
| 4.2 <i>Bacillus</i> spp. no controle da ramulose e mancha-angular sob condições de casa de vegetação .....  | 86 |
| 4.3 <i>Bacillus</i> spp. no controle da ramulose e da podridão-das maçãs do algodoeiro em condições de campo .....  | 89 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.4 Delineamento, tamanho das parcelas e análise estatística .....  | 91  |
| 4.5 Efeito <i>in vitro</i> de bactérias endosporogênicas sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> ( <i>Xam</i> ) e <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> ( <i>Cgc</i> )..... | 94  |
| 5 Resultados.....   | 95  |
| 5.1 Controle da ramulose do algodoeiro em casa de vegetação.....  | 95  |
| 5.2 Controle da mancha-angular do algodoeiro em casa de vegetação.....  | 99  |
| 5.3 Controle da ramulose do algodoeiro em campo de produção de algodão  | 103 |
| 5.4 Controle da podridão-das maçãs do algodoeiro em campo de produção de algodão .....  | 105 |
| 5.5 Produtividade dos tratamentos no ensaio de campo .....  | 107 |
| 5.6 Efeito <i>in vitro</i> de bactérias endosporogênicas sobre <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> e <i>Colletotrichum gossypii</i> var. <i>cephalosporioides</i> .....                              | 109 |
| 6 Discussão .....   | 110 |
| 7 Conclusões.....   | 115 |
| 8 Referências Bibliográficas.....   | 116 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS .....  | 122 |

## RESUMO GERAL

FERRO, Henrique Monteiro. **Bactérias endosporogênicas no manejo de doenças do algodoeiro**. 2009. 122p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.\*

A cultura do algodoeiro requer intenso controle fitossanitário para garantir boa produtividade e consequente rentabilidade ao produtor. Assim, há a necessidade de desenvolver métodos alternativos de controle de doenças para a racionalização do uso de fungicidas. Portanto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar 4 isolados bacterianos endosporogênicos (*Bacillus subtilis* UFLA285, *B. subtilis* ALB629, *Bacillus* spp. UFLA401 e *Paenibacillus lentimorbus* MEN2) no controle das principais doenças foliares do algodoeiro, como ramulose (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), mancha-angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*), mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), mancha-de-alternária (*Alternaria* sp.) e podridão-das-maçãs (complexo de patógenos). Foram avaliados métodos de aplicação dos isolados em ensaios realizados no período de 2007 a 2009, em casa de vegetação e em campo. Em casa de vegetação, todos os isolados foram eficazes no controle da mancha-angular e da ramulose, destacando-se UFLA285, que proporcionou melhor controle da mancha-angular. Em campo, todos os isolados foram eficazes no controle de mofo-branco, ramulose e podridão-das-maçãs. Os isolados UFLA285, ALB629 e MEN2 proporcionaram melhores controles de mofo-branco, podridão-das-maçãs e mancha-de-alternária do algodoeiro. A combinação dos três isolados antagonistas proporcionou melhor controle da ramulose e maior produtividade no campo, além da maior porcentagem de fibra. Os isolados endosporogênicos avaliados em casa de vegetação apresentaram diferentes níveis de controle da ramulose e mancha-angular quanto ao método de aplicação, exceto UFLA401, que não diferiu dentre as formas de aplicação no controle da ramulose. No campo, o melhor método e número de aplicação dos antagonistas foi o tratamento de sementes + 2 pulverizações para o controle da ramulose. UFLA285 não diferiu quanto ao método de aplicação no controle da podridão das maçãs em condições de campo. Portanto, com base na consistência dos resultados obtidos nas repetições dos ensaios, os isolados avaliados apresentam grande potencial no manejo integrado de doenças do algodoeiro.

Palavras-chave: Biocontrole, *Gossypium hirsutum*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus*.

---

Comitê Orientador: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Orientador), Vicente Paulo Campos – UFLA e Alan W. V. Pomella - UNIPAM

## GENERAL ABSTRACT

FERRO, Henrique Monteiro. **Bacteria sporogenic in the management of cotton diseases**. 2009. 122p. Dissertation (Master Program in Phytopathology) - Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The cotton cultivation requires intensive pest control to ensure good productivity and consequent profitability to the farmer. Thus, there is need to develop alternative disease control methods for the rational fungicide use. Therefore, this study aimed to evaluate 4 sporogenic bacterial isolates (*Bacillus subtilis* UFLA285, *B. subtilis* ALB629, *Bacillus* spp. UFLA401 and *Paenibacillus lentimorbus* MEN2) in the control of major cotton foliar diseases: ramulosis (*Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*), bacterial blight (*Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*), alternaria leaf spot (*Alternaria* sp.), the soilborne white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) or boll rot (pathogen complex). We evaluated different application forms of isolates from trials from 2007 to 2009, under greenhouse and field conditions. In greenhouse, all isolates were effective in control of bacterial blight and ramulosis, especially UFLA285 which provided better control of bacterial blight. In the field, all isolates were effective in control of white mold, ramulosis and boll rot. Isolates UFLA285, ALB629 and MEN2 provided better control of white mold, boll rot and alternaria leaf spot. The combination of the three antagonistic isolates provided better control of ramulosis and increased productivity in the field, and the highest fiber percentage. Sporogenic isolates assessed in greenhouse showed different control levels of ramulosis and cotton bacterial blight on the method of application, except UFLA401 which did not differ among the forms of application in the control of ramulosis. In the field, the best method and number of antagonist applications was the seed treatment + 2 sprays for ramulosis control. UFLA285 did not differ in the method of application in the control of the boll rot under field conditions. Therefore, based on the consistency of results obtained in the repetitions of the trials, the isolates have great potential in cotton integrated disease management.

Key words: Biocontrol, *Gossypium hirsutum*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus lentimorbus*.

---

Guidance Committee: Ricardo Magela de Souza - UFLA (Advisor), Vicente Paulo Campos – UFLA e Alan W. V. Pomella - UNIPAM

## INTRODUÇÃO GERAL

O algodoeiro (*Gossypium* sp.) é uma das mais antigas plantas domesticadas pelo homem e a espécie mais cultivada no mundo é *G. hirsutum* L.r. *latifolium* Hutch (Lee, 1984). Dentre as espécies vegetais cultivadas, esta é uma das mais aproveitadas pelo homem, pois é responsável por 50% da vestidura da população mundial, além de inúmeras aplicações de seus subprodutos (Beltrão et al., 2000).

Devido ao cenário econômico mundial do ano de 2009, a estimativa de cultivo para a safra 2009/10 é de 30,0 milhões de hectares, o que representa uma redução de 3% da área plantada no mundo (Discover Natural Fibres, 2009). No Brasil, há previsão de retração de 23% da área de cultivo de algodão para a safra 2009/10, reduzindo-a para 856,6 mil hectares (Companhia Nacional de Abastecimento-CONAB, 2009). Apesar da redução para a próxima safra, o Brasil é, atualmente, o quarto maior exportador mundial e o quinto maior produtor de algodão (Associação Brasileira dos Produtores de Algodão-ABRAPA, 2009).

Diante das dificuldades de mercado do algodão e do seu alto custo de produção, os produtores encontram outros desafios, principalmente em relação ao intenso controle fitossanitário que a cultura exige para garantir boa produtividade e consequente rentabilidade ao produtor. Dentre as doenças que atingem a cultura, destacam-se a ramulose, a mancha-angular, o mofo-branco, a podridão-das-maçãs e a mancha-de-alternária. Sendo esta última de maior importância econômica em regiões que adotam baixa tecnologia de produção de algodão e cultivares suscetíveis à doença.

A ramulose é frequentemente observada em campos de produção, associada a perdas quantitativas na cultura do algodoeiro (Cassetari Neto & Machado, 2005). Seu agente etiológico é o fungo *Colletotrichum gossypii* var.

*cephalosporioides*, o qual pode ser transmitido por sementes (Goulart, 2005), além de sobreviver nos restos de cultura (Araújo, 2008a). Uma vez introduzida na área, sob condições favoráveis ao seu progresso, a doença é rapidamente transmitida às plantas vizinhas, que apresentam inicialmente lesões necróticas que evoluem para perfurações no limbo em forma de estrela. Com o progresso da doença, o fungo causa encurtamento de internódios e envassouramento, inviabilizando a produção da planta infectada com perdas de produção variando de 38% a 75%, em função das condições ambientais, variedades e técnicas utilizadas no manejo (Cassetari Neto & Machado, 2005).

Em infecções precoces, a planta possui baixa produção, porém, em infecções tardias, a planta poderá produzir e transmitir o patógeno às sementes. Na formação de novos plantios, seja veiculado pela semente ou sobrevivendo saprofiticamente em restos de cultura, o patógeno infecta a plântula, causando tombamento de pré e pós-emergência (Araújo, 2008a).

A mancha-angular do algodoeiro é uma importante bacteriose que tem como agente etiológico a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) (*Xam*), a qual pode ser transmitida via sementes contaminadas, ocorrendo de forma generalizada sobre a cultura no cerrado brasileiro (Chitarra, 2005). A disseminação do patógeno na lavoura ocorre pelos respingos de água acompanhados de ventos fortes (Miranda & Suassuna, 2004), podendo ser responsável por grandes danos econômicos, devido à sua rápida disseminação e difícil controle (Chitarra, 2005). É potencialmente destrutiva em condições ambientais favoráveis à sua infecção e disseminação (alta umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e altas temperaturas), levando a perdas significativas na produção (Miranda & Suassuna, 2004). Os sintomas em folhas de algodão, após a colonização pela fitobactéria, são lesões angulares, delimitadas pelas nervuras secundárias e terciárias, inicialmente de aspecto úmido (encharcado) de coloração verde e oleosa, tornando-se posteriormente

parda e necrosada (Miranda & Suassuna, 2004). O patógeno também pode ser encontrado nas maçãs, causando manchas de coloração verde e aspecto oleoso e deprimidas na parte central que, geralmente, são colonizadas por fungos causadores de podridões (Cia, 1977; Yamamoto, 2003; Araújo, 2008a). Em cultivares suscetíveis, observam-se lesões necróticas nos pecíolos das folhas, no pedúnculo das maçãs e na haste principal das plantas infectadas com o patógeno (Juliatti & Polizel, 2003; Chitarra, 2005). Recentemente, observou-se, no estado de São Paulo, uma nova sintomatologia causada por *Xam*, denominada de crestamento foliar, pois, geralmente, é acompanhada de halo clorótico, além de sintomas em forma de “V” invertido a partir dos bordos foliares (Malavolta et al., 2008).

Nos últimos anos, o mofo-branco (*Sclerotinia sclerotiorum*) em algodoeiro vem causando surtos epidêmicos em áreas que antecedem culturas hospedeiras do patógeno, como soja, feijão e girassol. O sintoma do mofo-branco em algodoeiro é a murcha de ramos e pecíolos, com posterior seca das plantas. O patógeno pode infectar também as maçãs (Miranda & Suassuna, 2004), deixando-as com aspecto de podridão e coloração rósea. O patógeno produz estruturas de resistência, chamadas de escleródios, que podem permanecer viáveis no campo por mais de oito anos (Silva et al., 2009). Os escleródios são produzidos no interior ou no exterior da maçã colonizada pelo fungo e abaixo do córtex de hastes de plantas infectadas. As condições favoráveis ao patógeno são áreas com altitudes superiores a 800 m, onde predominam temperaturas noturnas amenas e formação de orvalho (Silva et al., 2009).

Outra doença importante nos campos de produção de algodão é a podridão-das-maçãs que ocorre, principalmente, no cerrado, onde o período de maior precipitação pluviométrica coincide com o período de formação das maçãs do baixeiro das plantas (Araújo, 2008b), além da utilização de plantios

adensados. A podridão-das maçãs é causada por um complexo de microrganismos oportunistas que colonizam sintomas causados por patógenos primários, como *Xam*. Alguns insetos, como o bicudo (*Anthonomus grandis*) e os percevejos (*Dysdercus* spp), também podem provocar porta de entrada para esses microrganismos (Araújo, 2008b).

A mancha-de-alternária em algodoeiro tem como agentes etiológicos duas espécies pertencentes ao gênero *Alternaria*. A mais comum é *Alternaria macrospora*, que afeta principalmente as folhas mais velhas, mas também pode incidir em folhas cotiledonares e maçãs. A outra espécie do gênero é *Alternaria alternata*, que também provoca lesões em folhas de algodoeiro, entretanto, com pouca importância econômica. Os sintomas da doença são pequenas manchas circulares de tonalidade marrom no centro e bordas enegrecidas, as quais evoluem para manchas maiores que raramente ultrapassam 1 cm de diâmetro. Quando as lesões envelhecem, o centro torna-se seco e quebradiço, podendo causar perfurações no limbo foliar. Em cultivares suscetíveis, as lesões podem coalescer e formar áreas necróticas irregulares, culminando com a queda das folhas (Coutinho & Suassuna, 2007).

A mancha-de-alternária é uma doença que não tem ocorrido com grande severidade nas regiões tradicionalmente produtoras de algodão do semiárido, entretanto, quando há maior intensidade e frequência de chuvas, tem havido ocorrência de surtos epidêmicos. Algumas práticas culturais são recomendadas no manejo da doença, como modificação nos métodos e na frequência de irrigação, rotação de culturas, destruição de restos culturais e manejo da adubação (Coutinho & Suassuna, 2007).

O intensivo aumento da área de plantio de algodão, às vezes sem rotação de culturas, fez com que a mancha-de-ramulária (*Ramularia areola*), antigamente considerada doença de importância secundária e de ocorrência no final do ciclo das lavouras (Miranda & Suassuna, 2004; Araújo, 2008a), passasse



a ser uma doença de início de ciclo do algodoeiro (Cassetari Neto & Machado, 2009), assumindo, assim, grande importância econômica, nos últimos anos (Cia & Salgado, 2005). Cassetari Neto & Machado (2009) relatam que, em lavouras da região centro-sul do Mato Grosso, foram necessárias até 7 aplicações de fungicidas em programas de controle químico da doença, enquanto que em lavouras da região médio-norte foram necessárias até 12 aplicações.

Para o controle das doenças do algodoeiro, além das pragas que causam danos à produção e à qualidade do algodão, são utilizados defensivos agrícolas durante todo o ciclo da cultura, iniciando antes do plantio no tratamento de sementes para controle de doenças transmitidas pelas mesmas e proteção contra patógenos presentes no solo. Portanto, o consumo de ingredientes ativos nesta cultura aumentou mais de quatro vezes, de 1990 a 2000 (Campanhola & Bettiol, 2003), representando 10% do montante total de defensivos consumidos no Brasil até o ano de 2006 (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola-SINDAG, 2006). Este percentual é uma representação idêntica do consumo de defensivos agrícolas no mundo, mas a área cultivada com algodão não representa mais que 2,5% da área cultivada no mundo, o que demonstra a utilização intensiva de defensivos para esta cultura. Dentre eles, 31% são fungicidas e 40% herbicidas (SINDAG, 2006).

Em geral, a cada ciclo do algodoeiro, são necessárias, em média, quatro aplicações de fungicidas para o controle das doenças fúngicas. Entretanto, em regiões com condições favoráveis ao progresso da mancha-de-ramulária, como, por exemplo, a região médio-norte do Mato Grosso, são necessárias até 12 aplicações de fungicidas para o seu controle (Cassetari Neto & Machado, 2009).

Com vistas à redução do consumo de defensivos, foi criado, em 1995, o programa nacional de racionalização do uso de defensivos. Dentre as estratégias preconizadas, destaca-se a busca por tecnologias alternativas no controle de doenças, como o uso de agentes microbianos (Soares et al., 2003). Além da

crescente demanda pela produção orgânica de algodão em países desenvolvidos foi estabelecida a meta de que, até 2013, importantes países consumidores, como Estados Unidos, Inglaterra e Suíça, importarão 10% de todo seu algodão de unidades de produção orgânica (Myers & Stolton, 1999).

Seja pela racionalização no uso de fungicidas na agricultura convencional e ou pelo aumento na produção orgânica de algodão, surge a busca por produtos alternativos que mantenham níveis aceitáveis de controle de doença. Neste contexto, os produtos mais promissores para o controle alternativo de doenças de plantas são os agentes microbianos de controle biológico (Campanhola & Bettiol, 2003).

Em um levantamento de produtos biológicos para o controle de doenças de plantas, o principal alvo são os fungos (51%), os principais microrganismos que compõem esses produtos são as bactérias (51%) e, dentre os gêneros de bactérias, *Bacillus* sp. é o principal (41%) (Montesinos, 2003).

O gênero *Bacillus* spp. tem considerável plasticidade fenotípica, garantida pelo crescimento desde 15°C até 60°C e formação de endósporos que lhe permitem sobreviver além destes limites de temperatura e na escassez de nutrientes ou água (Lamanna, 1940). Apresenta também crescimento rápido em condições aeróbicas e, eventualmente, sob condições anaeróbicas (Schisler et al., 2004). Consequentemente, isolados que demonstram alta eficiência de controle culminam mais facilmente em produtos formulados e disponíveis aos agricultores (Emmert & Handelsman, 1999). Além do mais, uma diversidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. tem sido estudada (Katz & Demain, 1977).

Em plantas, esses compostos têm potencial para promover o crescimento pela ação direta sobre a planta e/ou pelo controle de patógenos (Turner & Backman, 1991; Podile & Prakash, 1996), pela produção de fitormônios e a solubilização de nutrientes (Enebak et al., 1998). Esta característica foi relatada

associada ao controle de doenças por antibiose em algodão tratado com *Bacillus subtilis* Kodiak<sup>®</sup> (Brannen & Kenney, 1997).

A aplicação do agente de controle biológico pode ser feita por meio de aplicações foliares ou pelo tratamento de sementes (Musson, 1995). O tratamento de sementes é o método mais conveniente para introduzir uma bactéria antagonista no ambiente da raiz, pois o processo de germinação libera carboidratos e aminoácidos em abundância, na forma de exsudatos que garantem o desenvolvimento do antagonista (Lynch, 1978; Subrahmanyam et al., 1983).

Uma das limitações ao uso de agentes de controle biológico é a especificidade microrganismo-hospedeira e, até mesmo, microrganismo-patossistema (Enebak et al., 1998). Contudo, mesmo quando empregada para o controle de doenças em hospedeiros diferentes daquele de onde foram isolados, a colonização tem sido efetiva, como demonstrado para isolados de *Bacillus cereus* obtidos de *Sinaps* sp. e inoculados em algodão, em que a sobrevivência endofítica da bactéria foi de 72 dias, no interior da planta (Pleban et al., 1995). A colonização endofítica é uma característica desejável no controle de doenças exercido por agente de controle biológico (Brooks et al., 1994; Chen et al., 1995). Além da especificidade de hospedeiro e/ou patossistema, Machado (2000) aponta como possível limitação à sustentabilidade da técnica de controle a inconsistência de resultados relacionados à baixa capacidade de sobrevivência do antagonista frente às condições adversas do ambiente, como as variações em temperatura e umidade (Rattray et al., 1993; Meikle et al., 1995). Como forma de superar este desafio, duas estratégias podem ser adotadas: emprego de isolados com plasticidade fenotípica e formulações adequadas do agente de controle biológico. A primeira estratégia já foi discutida anteriormente e a segunda vem sendo obtida com pesquisas direcionadas para a obtenção de formulações adequadas desses microrganismos (Kloepper & Schroth, 1981).

Somando-se à sua eficiência no tratamento de sementes, aplicações foliares de *Bacillus subtilis* apresentam controle sobre doenças em diversas culturas, além de aumento no crescimento e na produção de plantas pela indução de resistência sistêmica (Esitken et al., 2002, 2006) ou antibiose direta (Romeiro et al., 2007).

O controle biológico pode ser consorciado a outras técnicas de manejo (Mills et al., 2002). Combinações de métodos químicos e biológicos já foram empregadas com sucesso (Luz, 2003; Medeiros et al., 2003), com efeito sinérgico. Mesmo usando metade da dose recomendada para a cultura, Luz (2003) obteve 100% de erradicação de fungos de sementes de trigo tratadas com uma combinação de *Bacillus subtilis* e triadimenol. Além do mais, foi observado aumento sinérgico do estande e do rendimento por hectare, com o uso de sementes tratadas com a combinação. Resultados semelhantes foram observados para a cevada e o milho.

O biocontrole de doenças do algodoeiro vem sendo estudado (Arya & Parashar, 2002; Ishida, 2008 a,b; Medeiros, 2009) e, para o controle da mancha-angular, três grupos de pesquisadores obtiveram sucesso utilizando *Bacillus* spp. No primeiro, Arya & Parashar (2002) obtiveram eficiência de controle quando o antagonista foi aplicado dois dias antes da inoculação. Observou-se um efeito de dose e diversos metabólitos com atividade antibiótica foram isolados. No segundo grupo, Ishida et al. (2008a) obtiveram eficiência de controle equivalente, quando o tratamento ocorreu sete dias antes da inoculação e, diferentemente do anterior, não encontrou efeito de dose e nem metabólito com atividade antibiótica direta, mas diversas respostas de defesa da planta foram ativadas em fenótipo típico de pré-condicionamento, característico de indução de resistência sistêmica (Beauchamp, 1993). No controle da mancha-angular e do tombamento via tratamento de sementes com bactérias endosporogênicas, Medeiros (2009) selecionou 3 dentre 368 isolados bacterianos formadores de

endósporos provenientes de solo rizosférico e endofíticos de raízes de algodoeiro das principais regiões produtoras de algodão do Brasil, além de outros isolados provenientes de centros de pesquisas (Ferro et al., 2008; Medeiros et al., 2008; Medeiros, 2009). Os isolados selecionados como os mais eficientes para o controle do tombamento e da mancha-angular via tratamento de sementes infectadas foram: *Bacillus subtilis* ALB629 (Mars Center for Cocoa Science, Itajuípe, BA - Fábio C. Chaves), *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 (Universidade Federal Rural de Recife, Recife, PE – Rosa Mariano), *Bacillus subtilis* UFLA285 e *Bacillus* spp UFLA401 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Ricardo Souza). Estes isolados também foram testados para o controle do tombamento em condições de campo, sendo significativamente superiores à testemunha e ao fungicida.

Dentre os estudos já realizados utilizando microrganismos biocontroladores de doenças do algodoeiro até o momento, nenhum foi realizado para avaliar a eficiência de diferentes métodos de aplicação, nem mesmo em condições de campo para o controle de doenças foliares da cultura.

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a eficiência dos isolados *Bacillus subtilis* UFLA285, *Bacillus* spp. UFLA401, *B. subtilis* ALB629 e *Paenibacillus lentimorbus* MEN2, por diferentes métodos de aplicação, no controle da ramulose e da mancha-angular em ensaios realizados em casa de vegetação, por dois anos consecutivos, além da forma e do número de aplicações dos antagonistas no controle da ramulose, mofo-branco, podridão-das maçãs e mancha-de-alternária, em condições de campo, nas safras 2007/08 e 2008/09.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.E. **Detecção e transmissão planta-semente de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa**: efeito de níveis de incidência na semente e do controle químico da parte aérea sobre o progresso da ramulose do algodoeiro. 2008a. 93p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ARAÚJO, A.E. **Podridão de maçãs do algodoeiro**: principais causas e manejo. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2008b. 22p. (Circular Técnica, 212).

ARYA, S.; PARASHAR, R.D. Biological control of cotton bacterial blight with phylloplane bacterial antagonists. **Tropical Agriculture**, Surrey, v.79, n.1, p.51-55, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE ALGODÃO.  
**Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abrapa.com.br/estatisticas.asp>>.  
Acesso em: 24 set. 2009.

BEAUCHAMP, C.J. Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents. **Phytoprotection**, Quebec, v.74, n.1, p.19-27, Apr. 1993.

BELTRÃO, N.E.M.; SOUZA, J.G.; PEREIRA, J.R. **Potencialidades de alguns subprodutos do algodoeiro**: I., fitomassa e seu subproduto principal, a celulose. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2000. 4p. (Comunicado Técnico, 114).

BRANNEN, P.M.; KENNEY, D.S. Kodiak registered: a successful biological-control product for suppression of soil-borne pathogens of cotton. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.3, p.169-171, Sept. 1997.

BROOKS, D.S.; GONZALEZ, C.F.; APPLE, D.N.; FILER, T.H. Evaluation of endophytic bacteria as potential biocontrol agents for oak wilt. **Biological Control**, Orlando, v.4, n.4, p.373-381, Dec. 1994.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: \_\_\_\_\_. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003. cap.1, p.13-52.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. **Doenças do algodoeiro**: diagnose e controle. Várzea Grande: Universidade de Várzea Grande, 2005. 47p.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. Manejo de doenças do algodoeiro. In: NEFIT, D. **Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. cap.13, p.159-174.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KLOPPER, J.W. Biological control of fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, Orlando, v.5, n.1, p.83-89, Mar. 1995.

CHITARRA, L.G. Qualidade ameaçada. **Revista Cultivar, Grandes Culturas**, Pelotas, ano 7, n.73, p.3-8, 2005.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.3, n.3, p.167-177, maio/jul. 1977.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, cap.8, p.41-52.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Levantamento da safra 2008/09 de algodão**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/>>. Acesso em: 20 set. 2009.

DISCOVER NATURAL FIBERS. **Cotton**: review of the world situation. Disponível em: <[http://www.cottonpromotion.org/features/international\\_year\\_of\\_natural\\_fibers/](http://www.cottonpromotion.org/features/international_year_of_natural_fibers/)>. Acesso em: 10 mar. 2009.

EMMERT, E.A.B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.171, n.1, p.1-9, Feb. 1999.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedling. **Forest Science**, Lawrence, v.44, n.1, p.139-144, 1998.

ESITKEN, A.; KARLIDAG, H.; ERCISLI, F.; ULMER, G.M.B.H.; STUTTGART, C.O. Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu-142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum* blight) of apricot. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.67, n.4, p.139-142, Aug. 2002.

ESITKEN, A.; PIRLAK, L.; TURAN, M.; SAHIN, F. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. **Scientia**, Murfreesboro, v.110, n.4, p.324-327, Dec. 2006.

FERRO, H.M.; SOUZA, R.M.; MEDEIROS, F.H.V.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, J.C.; SOARES, D.A.; SANTOS NETO, H.; ZANOTTO, E.; DORNELAS, G.A. *Bacillus* spp. para o tratamento de sementes de algodão contaminadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.34, p.S97, feb. 2008. Suplemento.

GOULART, A.C.P. Doenças iniciais do algodoeiro: identificação e controle. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. cap.15, p.425-449.

IAMAMOTO, M.M. **Doenças foliares do algodoeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, D.L.; POZZA, E.A. Rhizobacterium and acibenzolar-S-methyl (ASM) in resistance induction against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.1, p.27-34, Jan./Feb. 2008a.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; VILAS-BOAS, C.H.; SOUZA, J.T. Rizobactérias no controle da mancha-angular do algodoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.1, p.149-156, jan./fev. 2008b.

JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C. **Manejo integrado de doenças na cotonicultura brasileira**. Uberlândia: UFU, 2003. 142p.

KATZ, E.; DEMAINE, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. **Bacteriological Reviews**, Washington, v.41, n.2, p.449-474, 1977.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. **Phytopathology**, Saint Paul, v.71, n.6, p.590-592, 1981.



- LAMANNA, C. Relation between temperature growth range and size in the genus *Bacillus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.39, n.5, p.593-596, 1940.
- LEE, J.A. Cotton as a world crop. In: KOHEL, R.J.; LEWIS, C.F. (Ed.). **Cotton**. Madison: American Society of Agronomy, 1984. p.1-25.
- LUZ, W.C. da. Combinação dos tratamentos biológico e químico de semente de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.1, p.37-40, jan./fev. 2003.
- LYNCH, J.M. Microbial interaction around imbibed seeds. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v.89, n.1, p.165-167, May 1978.
- MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: UFLA, 2000. 137p.
- MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; DESTEFANO, S.A.L.; BERIAM, L.O.S.; PIZZINATTO, M.A.; CIA, E. Crestamento foliar, nova sintomatologia em algodoeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.34, n.2, p.168-171, abr./jun. 2008.
- MEDEIROS, F.H.V. **Rhizobacteria for cotton seed treatment**: screening, field efficacy and molecular modes of action. 2009. 101p. Thesis (Doctor in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- MEDEIROS, F.H.V.; MARIANO, R.L.R.; NASCIMENTO, A.R.P.; SILVA, A.L. Efeito combinado de agentes biológicos e químicos no tratamento de sementes visando o controle da mancha-aquosa do melão. In: REUNIÃO DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS, 8., 2003, Itabuna. **Anais...** Itabuna: CEPLAC, 2003. p.141.
- MEDEIROS, F.H.V.; SOUZA, R.M.; FERRO, H.M.; MEDEIROS, F.C.L.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, J.C.; SANTOS NETO, H.; SOARES, D.A.; ZANOTTO, E.; PARE, P.W. *Bacillus* spp. to manage seed-born *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* damping-off. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, n.8, p.S102, Aug. 2008. Supplement.
- MEIKLE, A.; AMIN-HANJANI, S.; GLOVER, L.N.; KILLHAM, K.; PROSSER, J. Matric potential and the survival and activity of a *Pseudomonas fluorescens* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.27, n.7, p.881-892, 1995.

MILLS, D.J.; COFFMAN, C.B.; TEASDALE, J.R.; EVERTS, K.L.; ABDUL-BAKI, A.A.; LYDON, J.; ANDERSON, J.D. Foliar disease in fresh-market tomato grown in different bed strategies and fungicide spray programs. **Plant Disease**, Quebec, v.86, n.9, p.955-959, Sept. 2002.

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. **Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2004. 47p. (Circular Técnica, 76).

MONTESINOS, E. Development registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. **International Microbiology**, Barcelona, v.6, n.4, p.245-252, Dec. 2003.

MUSSON, G. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. **Biocontrol Science and Technology**, Oxford, v.5, n.4, p.407-416, Dec. 1995.

MYERS, D.; STOLTON, S. **Organic cotton**: from field to final product. London: Intermediate Technology, 1999. 272p.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* by use of endophytic bacteria (*Bacillus* spp.). **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.101, n.6, p.665-672, June 1995.

PODILE, A.R.; PRAKASH, A.P. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF1. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, n.6, p.533-538, June 1996.

RATTRAY, E.A.S.; TYRRELL, J.A.; PROSSER, J.I.; GLOVER, L.A.; KILHAM, K. Effect of soil bulk density and temperature on wheat rhizosphere colonization by *lux*-marked *Pseudomonas fluorescens*. **European Journal of Soil Biology**, Oxford, v.29, n.2, p.73-82, Mar./Apr. 1993.

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

SCHISLER, D.A.; SLININGER, P.J.; BEHLE, R.W.; JACKSON, M.N. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v.94, n.11, p.1267-1271, 2004.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. Manejo do mofo-branco da soja. In: NEFIT, C. **Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. cap.17, p.205-214.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. **Defensivos agrícolas comercializados no Brasil**. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>. Acesso em: 14 mar. 2007.

SOARES, P.; CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W.; RODRIGUES, G.S. Proposta para o programa nacional de racionalização do uso de agrotóxicos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Ed.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003. cap.2, p.53-77.

SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E.C. (Org.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p.479-521.

SUBRAHMANYAN, P.; REDDY, M.N.; RAO, A.S. Exudation of certain organic compounds from seeds of groundnut. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.11, n.2, p.267-272, June 1983.

TURNER, J.T.; BACKAMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Quebec, v.75, n.4, p.347-353, Dec. 1991.

## **CAPÍTULO 1**

### **Bactérias endosporogênicas no controle da ramulose e mancha-angular do algodoeiro**

## 1 RESUMO

Visando avaliar o biocontrole da ramulose (*Colletotrichum gossypium* var. *cephalosporioides* - *Cgc*) e da mancha-angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* - *Xam*), em casa de vegetação, bem como o controle da ramulose em campo, utilizaram-se três isolados bacterianos endosporogênicos (*Bacillus subtilis* UFLA285, *B. subtilis* ALB629, and *Paenibacillus lentimorbus* MEN2) aplicados via tratamento de sementes e pulverizações foliares, aos 21, 28 e 35 dias após emergência. As plantas foram avaliadas quanto à incidência/folha para ramulose e severidade/folha para mancha-angular, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. No ensaio de campo, os tratamentos consistiram na aplicação dos antagonistas e suas respectivas combinações, via tratamento de sementes e pulverizações. As pulverizações iniciaram-se aos 30 dias após o plantio, acompanhando o intervalo das avaliações de incidência natural da ramulose. Todos os isolados testados foram eficazes para o controle da mancha-angular e da ramulose do algodoeiro. *Bacillus subtilis* UFLA285 proporcionou o maior controle da mancha-angular em casa de vegetação. Para a ramulose em casa de vegetação, os isolados apresentaram controle variando de 59% a 68%. No controle da ramulose em condições de campo, a combinação dos três isolados antagonistas proporcionou maior controle da doença e incremento da produtividade e porcentagem de fibra. Devido ao sucesso dos antagonistas no controle biológico de doenças do algodoeiro, ao aumento da qualidade de fibras, além de características biológicas que permitam sua viabilidade de formulação, trata-se de um antagonista com grande potencial para o manejo integrado de doenças do algodoeiro.

Palavras-chaves: Biocontrole; *Gossypium hirsutum*; bacteriose; *Colletotrichum gossypium* var. *cephalosporioides*

## 2 ABSTRACT

To evaluate the biological control of ramulosis (*Colletotrichum gossypium* var. *cephalosporioides*) and cotton bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) in greenhouse and control of ramulosis in field conditions, we used three sporogenic bacterial isolates (*Bacillus subtilis* UFLA285, *B. subtilis* ALB629 and *Paenibacillus lentimorbus* MEN2) applied as seed treatment and foliar spray. For the trials in the greenhouse, cotton seed were treated with antagonist suspension s and foliar sprays at 21, 28 and 35 days after emergence. The plants were evaluated for incidence/leaf to ramulosis and severity/leaf to bacterial blight at 7, 14, 21 and 28 days after inoculation. In the field trial, treatments consisted of application of the antagonists and their combination as seed treatment and spraying. The spraying began at 30 days after planting, following the range of assessments of natural ramulosis incidence. All tested isolates were effective for bacterial blight and ramulosis control. *Bacillus subtilis* UFLA285 provided greater control of bacterial blight in greenhouse. For the ramulosis in greenhouse, the isolates controlled the disease in the range of 59 to 68%. The ramulosis control in field conditions, the combination of the three antagonists provided greater control of the disease, increased productivity and fiber percentage. Due to the success of antagonists for biological control of cotton diseases, increased fiber quality, and biological characteristics that allow the viability of its formulation, it is an antagonist with high potential for the integrated management of cotton diseases.

Key words: Biocontrol; *Gossypium hirsutum*; bacteriose; *Colletotrichum gossypium* var. *cephalosporioides*

### 3 INTRODUÇÃO

O algodoeiro é uma das mais antigas plantas domesticadas pelo homem, havendo registros de utilização de mais de 5.000 anos atrás. No Brasil, a cultura do algodão é considerada de expressão devido ao seu valor econômico e social (Cia & Salgado, 2005). Plantios em pequenas áreas e sem tecnologia perderam espaço na cotonicultura brasileira atual, criando-se um novo modelo produtivo, com a utilização de altas tecnologias, investimento em qualidade de fibra e plantio em extensas áreas. Em adição, o crescimento das indústrias têxteis tem intensificado a importância desta cultura no país (Beltrão, 1999).

Acompanhando toda revolução tecnológica, novas doenças, e até mesmo aquelas já conhecidas e que não eram prejudiciais no passado, manifestam-se, trazendo grandes desafios à produção (Penna, 2000).

Como exemplo, a ramulose do algodoeiro, causada por *Colletotrichum gossypium* South. var. *cephalosporioides*, constatada pela primeira vez no município de Rancharia, SP, em 1936, se encontra disseminada por praticamente todas as regiões produtoras de algodão do Brasil (Cia & Salgado, 2005). É considerada uma das doenças de maior importância econômica, podendo ocasionar perdas superiores a 80%, dependendo da cultivar utilizada e das condições climáticas (Bürkle et al., 1999). O patógeno pode ser transmitido por sementes contaminadas (Goulart, 2005), além de sobreviver nos restos culturais (Araújo, 2008). Uma vez introduzida na área, sob condições favoráveis ao seu progresso, a doença é rapidamente transmitida às plantas vizinhas, as quais apresentam, inicialmente, lesões necróticas que evoluem para perfurações no limbo em forma de estrela. Com o progresso da doença, o fungo causa encurtamento de internódios e envassouramento, inviabilizando a produção da planta infectada.

A mancha-angular do algodoeiro, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Smith) (*Xam*), é uma importante bacteriose que afeta a cultura e pode ser transmitida via sementes contaminadas (Chitarra, 2005). Esta bacteriose é potencialmente destrutiva e de difícil controle sob condições ambientes favoráveis à infecção e à disseminação do patógeno (alta umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica, ventos fortes e altas temperaturas), levando a perdas significativas na produção (Miranda & Suassuna, 2004). Os sintomas em folhas de algodão são lesões angulares, delimitadas pelas nervuras secundárias e terciárias, inicialmente de aspecto úmido (encharcado), coloração verde e oleosa, tornando-se, posteriormente, pardas e necrosadas (Miranda & Suassuna, 2004).

O patógeno também pode ser encontrado nas maçãs, causando manchas de coloração verde, de aspecto oleoso e deprimidas na parte central, geralmente colonizadas por fungos causadores de podridões (Cia, 1977; Yamamoto, 2003; Araújo, 2008). Em cultivares suscetíveis, observam-se lesões necróticas nos pecíolos das folhas, no pedúnculo das maçãs e na haste principal das plantas infectadas (Juliatti & Polizel, 2003; Chitarra, 2005). Recentemente, observou-se, no estado de São Paulo, uma nova sintomatologia causada por *Xam*, denominada de crestamento foliar, pois, geralmente, é acompanhado de halo clorótico, além de sintomas em forma de “V” invertido, a partir dos bordos foliares (Malavolta et al., 2008).

O biocontrole de doenças do algodoeiro vem sendo estudado nos últimos anos e, no caso da mancha-angular, três grupos de pesquisadores obtiveram sucesso utilizando *Bacillus* spp. (Arya & Parashar, 2002a; Ishida et al., 2008; Medeiros, 2009). Arya & Parashar (2002a) obtiveram eficiência de controle quando o antagonista foi aplicado dois dias antes da inoculação. Observou-se efeito de dose e diversos metabólitos com atividade antibiótica foram isolados. Ishida et al. (2008) obtiveram eficiência de controle equivalente aplicando o



tratamento sete dias antes da inoculação e, diferentemente do anterior, não foram encontrados efeito de dose e nem metabólito com atividade antibiótica direta, mas diversas respostas de defesa da planta foram ativadas em fenótipo típico de pré-condicionamento, característico de indução de resistência sistêmica (Beauchamp, 1993).

No controle da mancha-angular e do tombamento via tratamento de sementes com bactérias endosporogênicas, Medeiros (2009) selecionou 3, dentre 368 isolados bacterianos formadores de endósporos provenientes de solo rizosférico e endofíticos de raízes de algodoeiro das principais regiões produtoras do Brasil, além de outros isolados provenientes de centros de pesquisas (Medeiros et al., 2008; Medeiros, 2009). Os isolados selecionados como os mais eficientes para o controle do tombamento e da mancha-angular via tratamento de sementes infectadas foram: *Bacillus subtilis* ALB629 - epífita de frutos de cacau (Mars Center for Cocoa Science, Itajuípe, BA - Fábio C. Chaves), *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 – epífita de frutos de melão (Universidade Federal Rural de Recife, Recife, PE – Rosa Mariano) e *Bacillus subtilis* UFLA285 – endófito de raízes de algodoeiro (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Ricardo Souza). Esses isolados também foram testados para o controle do tombamento em condições de campo, sendo significativamente superiores à testemunha e ao fungicida.

Associado ao controle de doenças, os isolados bacterianos podem promover o crescimento de plantas, principalmente pela produção de fitormônios ou solubilização de nutrientes (Enebak et al., 1998). Essa característica foi relatada associada ao controle de doenças por antibiose em algodão tratado com *Bacillus subtilis* Kodiak<sup>®</sup> (Brannen & Kenney, 1997).

Somando-se à sua eficiência no tratamento de sementes, aplicações foliares de *Bacillus subtilis* apresentam controle sobre patógenos em diversas culturas pela indução de resistência sistêmica (Esitken et al., 2002, 2006) ou

antibiose direta (Romeiro et al., 2007), além de aumento no crescimento e produção de plantas.

Dentre os estudos já realizados utilizando microrganismos biocontroladores de doenças do algodoeiro, até o momento nenhum foi realizado em condições de campo para o controle das principais doenças foliares da cultura. Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de testar os isolados bacterianos endosporogênicos mais eficientes no tratamento de sementes (Medeiros, 2009) para o controle da ramulose e da mancha-angular via pulverização foliar, em casa de vegetação, em ensaios realizados por dois anos consecutivos, além de suas respectivas combinações no controle da ramulose em condições de campo, na safra 2007/08.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Origem, preservação e produção de inóculo

#### Isolados de *Bacillus* spp.

A cada ensaio e em suas épocas de aplicação, os isolados *Bacillus subtilis* ALB629, *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 e *Bacillus subtilis* UFLA285, preservados a -80°C em peptona glicerol (Lazo & Gabriel, 1987), foram transferidos para o meio de cultura ágar nutriente pelo método de estrias paralelas e incubados, por 48 horas, a 28°C. Após o período de incubação, as células foram colhidas da superfície do meio, transferidas para meio caldo-nutriente e cultivadas, por 48 horas, em mesa agitadora orbital, a 150 rpm e 28°C. Em seguida, a concentração de endósporos foi ajustada em câmara de Neubauer a  $10^8$  células/mL para o tratamento de sementes e aplicações foliares.

#### Patógenos

O isolado de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), obtido da micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes (DFP-UFLA), foi cultivado em meio batata dextrose ágar (BDA), por 10 dias, a 25°C. Preparou-se uma suspensão de conídios em solução salina (0,85%) e ajustou-se em câmara de Neubauer, à concentração de  $10^6$  conídios/mL, para inoculação em plantas de algodão, sob condições de casa de vegetação.

Para *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), utilizou-se o isolado IB1153, proveniente da coleção de fitobactérias do Instituto Biológico de São Paulo. Para uso experimental, IB1153, preservado em peptona glicerol a -80°C (Lazo & Gabriel, 1987) e em folhas herborizadas, foi repicado para meio 523 (Kado & Heskett, 1970), pelo método de estrias paralelas e incubado, por 48 horas, a 28°C. Em seguida, transferiu-se para meio 523 líquido e, posteriormente, à mesa orbital agitadora a 100 rpm, por 24 horas, a 28°C. Após

esse período, pipetaram-se 100 µL da suspensão em meio 523, espalhando-se com alça de Drigalsky esterilizada e incubou-se, por 48 horas, a 28°C. Preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina (0,85%) e a concentração foi ajustada a 10<sup>8</sup> ufc/mL, em espectrofotômetro de luz ( $A_{520} = 0,7$ ), para inoculação em plantas de algodão, sob condições de casa de vegetação.

#### **4.2 *Bacillus* spp. no controle da ramulose e mancha-angular sob condições de casa de vegetação**

Os isolados de *Bacillus subtilis* ALB629, *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 e *Bacillus subtilis* UFLA285 foram testados em ensaios repetidos por dois anos consecutivos (2008 e 2009) em condições de casa de vegetação para o controle da ramulose e mancha-angular. Os ensaios foram realizados em casa de vegetação do DFP/UFLA, município de Lavras, Minas Gerais, Brasil (915 m altitude, 21°13'34''S e 44°58'31''O).

Nos ensaios para controle da ramulose, utilizou-se a cv. Deltaopal (suscetível) e, para mancha-angular, a cv. Acala 90 (suscetível). Para os ensaios, as sementes foram microbiolizadas com os antagonistas, na dosagem de 2 mL/g de sementes previamente desinfestadas (NaClO 2% a 2 minutos), secas ao ar e à temperatura ambiente por 12 horas, sendo, em seguida, semeadas em vasos de 5 litros contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Assim que as plantas atingiram a primeira folha definitiva expandida (21 dias após o plantio e 7 dias antes da inoculação), os antagonistas foram pulverizados semanalmente na parte aérea até o escorrimento, totalizando três aplicações. A primeira aplicação ocorreu aos sete dias antes da inoculação; a segunda, um dia após a inoculação e a terceira, aos sete dias após a inoculação do patógeno. Como padrões de controle da ramulose e mancha-angular, utilizaram-se, respectivamente, os fungicidas pyraclostrobin (3mL i.a./L) e oxicloreto de cobre (2g/mL) aplicados uma semana antes e após a inoculação de *Cgc* e *Xam*. Em todos os ensaios realizados, tanto

para controle da ramulose quanto para controle da mancha-angular do algodoeiro, foram utilizadas as testemunhas acibenzolar-S-metil (ASM) (7,5g i.a/100L água) e água, acompanhando os intervalos de aplicação dos antagonistas.

Realizou-se também um ensaio, a fim de verificar o efeito das combinações dos isolados e de ASM, isoladamente, no controle da ramulose em casa de vegetação, conforme metodologias de tratamento de sementes e pulverização descritas anteriormente. A inoculação de *Cgc* foi realizada aos 7 dias após a primeira aplicação dos tratamentos, 28 dias após emergência (DAE), pela pulverização da parte aérea das plantas, até o escorrimento com uma suspensão a  $10^6$  conídios/mL. Essa época de inoculação refere-se ao estágio V2, estágio fenológico mais apropriado para a inoculação de *Cgc* em plantas de algodão (Barrocas et al., 2009). Fez-se câmara úmida das plantas 24 horas após a inoculação. As plantas foram avaliadas, quanto à incidência de lesões em folhas, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação de *Cgc*.

A inoculação de *Xam* também foi realizada 7 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (28 DAE) pela pulverização da parte aérea das plantas até o escorrimento com uma suspensão a  $10^8$  ufc/mL. Fez-se câmara úmida das plantas 24 horas antes e após a inoculação. As plantas foram avaliadas quanto à severidade da mancha-angular aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação, de acordo com a escala de Sidhu & Webster (1977) adaptada por Ishida (2004), em que 0 = 0% de área foliar lesionada, 1 = de 1% a 25% de área foliar lesionada; 2 = de 26% a 50% de área foliar lesionada; 3 = de 51% a 75% de área foliar lesionada e 4 = acima de 76% de área foliar lesionada.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso com 4 repetições (2 plantas/vaso) por tratamento. Para os ensaios de controle da ramulose, a partir dos dados de incidência da doença em folhas, foi calculada a porcentagem média de folhas com lesões por repetição. Os dados de porcentagem de incidência da

ramulose foram utilizados para cálculo da área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) (Shanner & Finney, 1977).

Previamente ao ensaio de campo, realizou-se um ensaio de misturas de isolados, a fim de avaliar sua eficiência no controle da ramulose. As plantas foram avaliadas, quanto à severidade da ramulose, aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação de CGC, de acordo com escala de notas de 1 a 5, descrita por Cia (1977), em que plantas 1 = sem sintomas; 2 = apenas lesões necróticas nas folhas ou ramos; 3 = comprometimento da região apical; 4 = morte do meristema e superbrotamento e 5 = superbrotamento com redução do porte de plantas em relação às plantas saudáveis.

Os dados de severidade da ramulose e da mancha-angular foram transformados de acordo com o índice de McKinney (1923) para cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) (Shanner & Finney, 1977). Os dados de AACPI e AACPS foram submetidos à análise de variância, separadamente e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Ao término de cada ensaio realizado em casa de vegetação, exceto o ensaio com misturas de isolados, coletou-se a parte aérea das plantas, as quais foram colocadas em saco de papel (kraft) e levadas à estufa de circulação de ar quente, até atingir peso constante. Os dados de peso da matéria seca foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2000).

#### **4.3 *Bacillus* spp. no controle da ramulose sob condições de campo**

Os isolados *Bacillus subtilis* ALB629, *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 e *Bacillus subtilis* UFLA285, avaliados em condições de casa de vegetação para o controle da ramulose e da mancha-angular do algodoeiro, foram levados a condições de campo em área comercial de produção de algodão, situada na Fazenda Farroupilha, município de Presidente Olegário, MG, Brasil (987 m

altitude, 18°05'21''S e 46°29'16''O). A área experimental é de Latossolo Vermelho Escuro, tendo a correção do solo, a adubação no plantio e a cobertura sido realizadas de acordo com os resultados da análise química e física do solo para a necessidade da cultura. O plantio foi realizado em dezembro de 2008 e o ensaio conduzido até a colheita, em agosto de 2009.

No ensaio de campo, utilizou-se a cv. Fibermax 993 e o tratamento de sementes padrão da fazenda baseou-se na aplicação de carbofurano (furadan; 1,5L p.c./100 kg de sementes), thiamethoxam (Cruiser 600FS; 600mL p.c./100 kg semente), dietil-fosforotioato (Permit 500 DS; 1,2 kg p.c./100 kg de semente), fludioxonil-metalaxil-M (Maxim XL; 100 mL p.c./100 kg de sementes), carboxina – tiram (Vitavax, 800 mL p.c./100 kg de sementes) e cola (acetato de polivinila PVA 150mL/100 kg semente). Já a testemunha água consistiu na aplicação via tratamento de sementes de todos agroquímicos utilizados no tratamento padrão da fazenda, exceto os fungicidas.

Os isolados de *Bacillus* spp. foram multiplicados como descrito anteriormente e utilizados separadamente e em misturas para o tratamento de sementes. Esse tratamento consistiu na aplicação da suspensão bacteriana ( $10^8$  endósporos/mL) na dosagem de 1,2 L/100 kg de sementes e demais agroquímicos utilizados para o tratamento padrão da fazenda, exceto fungicidas. Durante o plantio, todas as parcelas do ensaio foram tratadas no sulco de plantio com carbofurano (Furadan 350 SC; 1L p.c./ha) e espalhante adesivo (SAG 0,015L), com vazão de 30L/ha.

Nas aplicações dos antagonistas foi utilizado espalhante adesivo siliconado 0,1 v/v % e as mesmas iniciaram-se aos 30 DAP, acompanhando o intervalo das avaliações de incidência da ramulose, aproximadamente 25 dias, até 138 DAP (Tabela 1). O tratamento padrão de fungicida do ensaio foi realizado de acordo com o manejo da fazenda para o controle de doenças na cultura (Tabela 2).

TABELA 1 Intervalos e número aplicação/avaliação via pulverização foliar de *Bacillus* spp. no controle da ramulose em algodoeiro.

| <b>APLICAÇÃO/AVALIAÇÃO</b> | <b>DAP*</b> |
|----------------------------|-------------|
| 1                          | 44          |
| 2                          | 69          |
| 3                          | 96          |
| 4                          | 118         |
| 5                          | 138         |

\*Dias após o plantio.

TABELA 2 Fungicidas utilizados para o controle das principais doenças foliares do algodoeiro de ocorrência natural na Fazenda Farroupilha, com suas respectivas dosagens e dias de aplicação.

| <b>FUNGICIDAS</b>                                      | <b>DOSE (L/ha)</b> | <b>DAP</b> |
|--|--------------------|------------|
| Portero <sup>1</sup> (Carbendazim)                     | 0,6                | 45         |
| Priori-Xtra <sup>2</sup> (Azostrobina + Ciproconazol)  | 0,5                | 84         |
| Mertim <sup>3</sup> (Hidróxido de fentina)             | 0,6                | 121        |
| Priori-Xtra <sup>4*</sup> (Azostrobina + Ciproconazol) | 0,5                | 140        |

\*Nas aplicações de Priori-Xtra foi utilizado óleo mineral Nimbus 0,2% v/v; vazão: 200L/ha. <sup>1</sup>benzimidazol; <sup>2</sup>estrobilurina + triazol; <sup>3</sup>organicoestânico; <sup>4</sup>estrobilurina + triazol.

Avaliou-se a incidência da ramulose em 10 plantas amostradas aleatoriamente por linha (1 planta/m), totalizando 30 plantas (3 linhas). A avaliação da incidência da ramulose consistiu na observação de sintomas típicos da doença em folhas presentes nos dois últimos entrenós superiores da haste principal da planta de algodão.



As pulverizações das suspensões dos antagonistas, dos fungicidas e depois dos agroquímicos utilizados para o manejo de pragas foram realizadas por atomizador de CO<sub>2</sub> acoplado com bicos do tipo cone vazio J4-2 e a pressão de trabalho constante de 30 lb/pol<sup>2</sup>, gerando uma vazão de 200 L/ha.

Ao término do ensaio, foi avaliada a produtividade de algodão em caroço em kg/tratamento e extrapolado para @/ha, de acordo com o espaçamento entre linhas utilizado. Também foram realizadas amostragens da produção de cada parcela e enviadas para o Centro Nacional de Pesquisa em Algodão – Embrapa Algodão (Campina Grande, PB, Brasil) para a análise da qualidade das características físicas da fibra de algodão em equipamento HVI (high volume instruments).

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com quatro repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por uma unidade experimental ou parcela. O tamanho das parcelas foi de 12 m de comprimento por 4,5 m de largura (5 linhas), com 8 sementes/m e espaçamento entre linhas de 0,90 m. Cada parcela útil constituiu-se de três linhas centrais de 10 m de comprimento.

A porcentagem de incidência da doença foi utilizada para o cálculo AACPI proposta por Shanner & Finney (1977). Estes dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05) utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2000).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Controle da ramulose do algodoeiro em casa de vegetação

Em ensaios realizados nos anos de 2008 e 2009, as médias de controle da ramulose pelos isolados utilizados não diferiram entre si, pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ), variando em torno de 63,7% em relação à testemunha inoculada com o patógeno. O isolado *Bacillus subtilis* ALB629 se destacou entre os demais, pois, não diferiu estatisticamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ) do tratamento ASM, atingindo 68,3% de redução AACPI da ramulose em relação à testemunha. Já o controle padrão (pyraclostrobin) foi estatisticamente superior pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) aos demais tratamentos, com controle médio de 94,8% da ramulose (Tabela 3).

TABELA 3 Efeito de antagonistas, fungicida pyraclostrobin e acibenzolar-S-metil no controle da ramulose do algodoeiro em ensaios realizados em dois anos consecutivos, sob condições de casa de vegetação.

| TRATAMENTOS                           | AACPI <sup>2</sup>               | CONTROLE (%) | PESO (g)             | AUMENTO (%) |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------|----------------------|-------------|
| Testemunha absoluta                   | 37,1 <sup>1</sup> a <sup>3</sup> | --           | 12,2 <sup>1</sup> cd | 11,6        |
| Fungicida                             | 78,8 a                           | 94,8         | 15,9 f               | 44,8        |
| Acibenzolar-S-Metil                   | 361,7 b                          | 76,3         | 8,6 a                | -21,3       |
| <i>B. subtilis</i> ALB629             | 483,5 bc                         | 68,3         | 13,5 e               | 23,3        |
| <i>Bacillus subtilis</i> UFLA285      | 557,7 c                          | 63,4         | 12,5 de              | 14,1        |
| <i>Paenibacillus lentimorbus</i> MEN2 | 615,1 c                          | 59,6         | 11,3 bc              | 2,6         |
| Testemunha inoculada                  | 1522,9 d                         | -            | 11,0 b               | -           |
| CV (%)                                | 10,8                             |              | 3,9                  |             |

<sup>1</sup>Médias de ensaios realizados em dois anos sucessivos, sob condições de casa de vegetação. <sup>2</sup>Área abaixo da curva de progresso de incidência (AACPI) da ramulose do algodoeiro. <sup>3</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

No momento da inoculação das plantas com CGC, a testemunha absoluta foi protegida com saco plástico para evitar sua contaminação com inóculo do patógeno. Porém, a mesma apresentou uma pequena AACPI. Provavelmente, isso ocorreu devido ao inóculo secundário proveniente das plantas doentes e disperso pela água de irrigação (pulverização).

Quanto à variável peso da matéria seca das plantas, observou-se que o tratamento pyraclostrobin proporcionou o maior incremento em relação aos demais tratamentos pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), atingindo o patamar de 44,8%

em relação à testemunha inoculada. Os isolados *Bacillus subtilis* ALB629 e *Bacillus subtilis* UFLA285 também proporcionaram aumentos significativos no peso matéria seca de plantas, com 23,3% e 14,1% em relação à testemunha, respectivamente. O tratamento com o indutor de resistência ASM promoveu o decréscimo de 21,3% do peso da matéria seca das plantas em relação à testemunha inoculada (Tabela 3).

## **5.2 Efeito das combinações dos isolados no controle da ramulose em casa de vegetação**

Todas as plantas tratadas com os isolados e suas combinações diferiram significativamente da testemunha inoculada. Os melhores controles foram proporcionados pelos tratamentos com os isolados *Bacillus subtilis* ALB629 e *B. subtilis* UFLA285, isolados e combinados, e também a combinação de *B. subtilis* ALB629 + *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 com 52,8% de redução da AACPD em relação à testemunha, não diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) do tratamento ASM (Tabela 4).

TABELA 4 Efeito das combinações dos isolados no controle da ramulose em casa de vegetação.

| TRATAMENTOS                                | AACPS <sup>6</sup>  |                | CONTROLE (%) |
|--|---------------------|----------------|--------------|
| ALB629 <sup>1</sup> + UFLA285 <sup>2</sup> | 400,00 <sup>5</sup> | a <sup>7</sup> | 52,8         |
| ALB629+MEN2 <sup>3</sup>                   | 400,00              | a              | 52,8         |
| ALB629                                     | 400,00              | a              | 52,8         |
| UFLA285                                    | 400,00              | a              | 52,8         |
| Acibenzolar-S-Metil                        | 433,33              | a              | 48,8         |
| MEN2+ UFLA285                              | 473,33              | b              | 44,1         |
| MEN2                                       | 506,66              | b              | 40,2         |
| ALB629+MEN2+ UFLA285                       | 593,33              | c              | 29,9         |
| INOC <sup>4</sup>                          | 846,66              | d              | -            |
| CV(%)                                      | 11,81               |                |              |

ALB629: *Bacillus subtilis*; <sup>2</sup>UFLA285: *B. subtilis*; <sup>3</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>4</sup>INOC: testemunha inoculada; <sup>5</sup>Médias de ensaios realizados em dois anos sucessivos, sob condições de casa de vegetação. <sup>6</sup>Área abaixo da curva de progresso de severidade (AACPS) da ramulose do algodoeiro. <sup>7</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

### 5.3 Controle da mancha-angular do algodoeiro em casa de vegetação

A redução média da AACPS da mancha-angular, nos anos 2008 e 2009, proporcionada pelos isolados bacterianos de biocontrole foi de 54,0%. O isolado *B. subtilis* UFLA285 se destacou, sendo estatisticamente superior aos demais tratamentos pelo teste Tukey (P<0,05), com controle médio de 62,6% da doença. *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 e *B. subtilis* ALB629 proporcionaram controle

estatisticamente semelhante pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ao do produto registrado para o controle da mancha-angular, ASM. Já o tratamento com oxicleto de cobre proporcionou controle estatisticamente inferior em relação aos demais tratamentos, com média de controle de 36,5% da enfermidade em questão (Tabela 5).

TABELA 5 Efeito de antagonistas, oxicleto de cobre e acibenzolar-S-metil no controle da mancha-angular do algodoeiro e peso da matéria seca.

| TRATAMENTOS                           | AACPS <sup>2</sup>               | CONTROLE PESO (%) | (g)                | AUMENTO (%) |
|---------------------------------------|----------------------------------|-------------------|--------------------|-------------|
| Testemunha absoluta                   | 12,9 <sup>1</sup> a <sup>3</sup> | --                | 7,5 <sup>1</sup> d | 81,4        |
| <i>Bacillus subtilis</i> UFLA285      | 322,3 b                          | 62,6              | 6,5 bc             | 55,8        |
| <i>Paenibacillus lentimorbus</i> MEN2 | 425,2 c                          | 50,7              | 7,0 cd             | 68,8        |
| <i>B. subtilis</i> ALB629             | 440,6 c                          | 48,9              | 6,5 bc             | 56,0        |
| Acibenzolar-S-metil                   | 460,7 c                          | 46,5              | 4,9 a              | 18,6        |
| Oxicleto de cobre                     | 547,1 d                          | 36,5              | 5,8 b              | 38,9        |
| Testemunha inoculada                  | 861,6 e                          | -                 | 4,1 a              | -           |
| CV (%)                                | 4,7                              |                   | 5,9                |             |

<sup>1</sup>Médias de ensaios realizados em dois anos sucessivos, sob condições de casa de vegetação. <sup>2</sup>Área abaixo da curva de progresso de severidade (AACPS) da mancha-angular do algodoeiro. <sup>3</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Durante a inoculação das plantas com *Xam*, a testemunha absoluta foi protegida com saco plástico para evitar sua contaminação com inóculo do

patógeno. Porém, a mesma apresentou pequena AACPS, sendo, provavelmente, causada por inóculo secundário oriundo de plantas doentes e disperso pela água de irrigação (pulverização).

Quanto à variável peso da matéria seca das plantas, observou-se o incremento médio de 60,2%, proporcionado pelos isolados bacterianos de biocontrole de doenças em relação à testemunha inoculada, sendo o melhor resultado obtido com *Paenibacillus lentimorbus* MEN2, o qual diferiu estatisticamente da testemunha inoculada proporcionando aumento de 68,8% e não diferiu estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) da testemunha absoluta. Quanto ao tratamento com ASM não se observou diferença significativa em relação à testemunha inoculada (Tabela 5).

#### **5.4 Controle da ramulose em campo de produção de algodão**

Dentre os tratamentos para o controle da ramulose do algodoeiro em condições de campo, *B. subtilis* ALB629, isoladamente, se destacou, com 22,9% de controle da doença, não diferindo significativamente, pelo teste Tukey, ( $P < 0,05$ ) do tratamento com a mistura dos três isolados (*B. subtilis* ALB629 + *P. lentimorbus* MEN2 + *B. subtilis* UFLA285), além de exercer controle superior ao do tratamento fungicida (Tabela 6).

TABELA 6 Eficiência de antagonistas, isolados e em combinação, e fungicida no controle da ramulose em campo de produção de algodão.

| TRATAMENTOS                                       | AACPI <sup>6</sup> |                | CONTROLE (%) |
|---|--------------------|----------------|--------------|
| ALB629 <sup>1</sup>                               | 10420,0            | a <sup>7</sup> | 22,9         |
| ALB629 + MEN2 <sup>2</sup> + UFLA285 <sup>3</sup> | 10543,3            | a              | 22,0         |
| ALB629+UFLA285                                    | 11560,0            | b              | 14,5         |
| FUNG <sup>4</sup>                                 | 11745,0            | bc             | 13,1         |
| UFLA285+MEN2                                      | 12177,5            | bc             | 9,9          |
| UFLA285   | 12350,0            | cd             | 8,7          |
| ALB629+MEN2                                       | 13017,5            | de             | 3,7          |
| MEN2  | 13358,3            | e              | 1,2          |
| ÁGUA <sup>5</sup>                                 | 13522,5            | e              | 0,0          |
| CV (%) 2,1  |                    |                |              |

<sup>1</sup>ALB629: *Bacillus subtilis*; <sup>2</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>3</sup>UFLA285: *B. subtilis*; <sup>4</sup>FUNG: Vide Tabela 2; <sup>5</sup>ÁGUA: Testemunha; <sup>6</sup>Área abaixo da curva de progresso de incidência (AACPI) da ramulose do algodoeiro. <sup>7</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.



### 5.5 Produtividade e qualidade de fibras

Quanto à produtividade de plantas tratadas e avaliadas em campo, os tratamentos com fungicidas e a combinação dos três isolados (*B. subtilis* ALB629 + *P. lentimorbus* MEN2 + *B. subtilis* UFLA285) apresentam maior produtividade, 370,8 e 383,3 @/ha (Tabela 7), em relação à testemunha água.

TABELA 7 Eficiência de antagonistas, isolados e em combinação, e fungicida na produtividade de algodoeiro em campo de produção comercial, na safra 2007/08.

| TRATAMENTOS                 | PRODUTIVIDADE |       |                |
|-----------------------------|---------------|-------|----------------|
|                             | kg/ha         | @/ha  |                |
| ALB629 <sup>1</sup>         | 4000,0        | 266,6 | a <sup>6</sup> |
| ALB629+UFLA285 <sup>2</sup> | 4312,5        | 287,5 | ab             |
| ALB629+MEN2 <sup>3</sup>    | 4562,5        | 304,1 | ab             |
| UFLA285                     | 5000,0        | 333,3 | bc             |
| MEN2                        | 5062,5        | 337,5 | bc             |
| ÁGUA <sup>4</sup>           | 5218,7        | 347,9 | bc             |
| UFLA285+MEN2                | 5250,0        | 350,0 | bc             |
| FUNG <sup>5</sup>           | 5562,5        | 370,8 | c              |
| ALB629+MEN2+ UFLA285        | 5750,0        | 383,3 | c              |
| CV(%) 6,76                  |               |       |                |

<sup>1</sup>ALB629: *Bacillus subtilis*; <sup>2</sup>UFLA285: *B. subtilis*; <sup>3</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>4</sup>ÁGUA: Testemunha; <sup>5</sup>FUNG: Vide Tabela 2; <sup>6</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Quanto à variável porcentagem de fibras, os tratamentos *P. lentimorbus* MEN2, os fungicidas, *B. subtilis* ALB629 e a combinação dos 3 isolados foram significativamente superiores à testemunha água, pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Para a variável comprimento de fibras (UHM), todos os tratamentos, exceto *P. lentimorbus* MEN2, foram estatisticamente iguais, pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ), ao tratamento com fungicidas e, na variável uniformidade (UNF), todos os tratamentos não diferiram do tratamento com fungicidas (Tabela 8).

TABELA 8 Propriedades físicas da fibra de algodão relacionadas à qualidade da fiação e tecelagem, proporcionadas pelos antagonistas e fungicidas em campo de produção comercial de algodão, na safra 2007/08.

| TRATAMENTOS                             | FIBRA <sup>6</sup>   | UHM <sup>7</sup> | UNF <sup>8</sup> | STR <sup>9</sup> | ELG <sup>10</sup> | MIC <sup>11</sup> |
|---|----------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| ÁGUA <sup>4</sup>                       | 40,0 a <sup>12</sup> | 29,7 b           | 84,9 ab          | 28,6 abc         | 8,0 a             | 3,5 a             |
| ALB629 <sup>1</sup>                     | 43,0 b               | 28,9 ab          | 84,9 ab          | 28,8 abc         | 7,2 a             | 3,7 a             |
| ALB629 + MEN2                           | 42,0 ab              | 29,2 ab          | 85,9 b           | 29,2 abc         | 7,3 a             | 3,8 ab            |
| ALB629 + MEN2 +<br>UFLA285 <sup>2</sup> | 44,0 b               | 28,2 ab          | 84,4 ab          | 27,8 ab          | 7,7 a             | 3,7 a             |
| ALB629 + UFLA285                        | 42,1 ab              | 28,3 ab          | 85,2 ab          | 30,1 c           | 7,4 a             | 4,2 c             |
| FUNG <sup>5</sup>                       | 42,7 b               | 29,8 b           | 85,0 ab          | 27,4 a           | 7,1 a             | 3,8 ab            |
| MEN2 <sup>3</sup>                       | 42,7 b               | 27,7 a           | 84,5 ab          | 28,4 abc         | 7,5 a             | 4,0 bc            |
| UFLA285                                 | 42,0 ab              | 28,6 ab          | 83,7 a           | 27,8 ab          | 7,2 a             | 3,8 ab            |
| UFLA285 + MEN2                          | 42,0 ab              | 28,9 ab          | 85,3 ab          | 29,6 bc          | 7,5 a             | 3,8 ab            |
| CV (%)                                  | 2,0                  | 2,1              | 0,8              | 2,3              | 4,8               | 2,8               |

<sup>1</sup>ALB629: *Bacillus subtilis*; <sup>2</sup>UFLA285: *B. subtilis*; <sup>3</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>4</sup>ÁGUA: Testemunha; <sup>5</sup>FUNG: Vide Tabela 2; <sup>6</sup>FIBRA-% de fibra; <sup>7</sup>UHM - comprimento (mm); <sup>8</sup>UNF - uniformidade (%); <sup>9</sup>STR - resistência (g/tex); <sup>10</sup>ELG - alongamento à ruptura (%); <sup>11</sup>MIC - índice micronaire.

<sup>12</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade.

Para a variável resistência (STR), o tratamento com a combinação dos isolados de *B. subtilis* ALB629 + UFLA285 foi significativamente superior ao tratamento com fungicidas. Todos os tratamentos foram significativamente semelhantes quanto à variável alongamento à ruptura (ELG). Já para a variável índice micronaire, a combinação dos isolados de *B. subtilis* ALB629 + UFLA285 foi significativamente superior à testemunha água e ao tratamento com fungicidas (Tabela 8).

## 6 DISCUSSÃO

Os isolados bacterianos utilizados no biocontrole da ramulose e da mancha-angular do algodoeiro foram eficazes tanto em condições de casa de vegetação, mantendo consistência dos resultados nas repetições dos experimentos, quanto em condições de campo.

Para o controle da mancha-angular do algodoeiro, os isolados bacterianos obtiveram resultados expressivos, haja vista que o produto oxiclreto de cobre (registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA) recomendado por Andrei (2009), não controlou a doença em níveis satisfatórios. A eficiência de fungicidas cúpricos há tempos vem apresentando resultados contraditórios em outros trabalhos para controle de bacterioses (Nascimento et al., 2000; Pereira et al., 2000). Segundo Cassetari Neto & Machado (2009), a pulverização de fungicidas cúpricos no controle da mancha-angular do algodoeiro reduz a severidade da doença e plantas infectadas apresentam recuperação. Isso talvez ocorra pelo fato de eles agirem indiretamente no controle da bacteriose, como um nutriente foliar, não existindo dados concretos de que o oxiclreto de cobre seja realmente efetivo no controle da mancha-angular do algodoeiro (Chitarra, 2005; Araújo, 2008).

No Brasil, na maioria das áreas de produção de algodão já se utilizam cultivares resistentes à bacteriose. Porém, há sempre o risco do desenvolvimento ou da entrada no país de novas raças virulentas, que possam quebrar a resistência das cultivares utilizadas pelos agricultores. Em 1983, surgiu, na África, uma nova raça de *Xam*, altamente virulenta, que quebrou a resistência de todas as cultivares comerciais de algodão, chamada de *high virulent strain* (HVS) e tratada como raça 20 (Chakrabarty et al., 1997). Huang et al. (2008) estudaram o isolado HVS (GSPB 2388) proveniente de lavouras de algodão do Sudão que produzia sintomas atípicos da mancha-angular e verificou que a atividade da

enzima celulase extracelular foi significativamente superior à do isolado da raça 18 (GSPB 1386), explicando o maior grau de patogenicidade da raça 20. Portanto, é de extrema importância o desenvolvimento de estratégias para evitar o surgimento de raças altamente virulentas no país.

Algumas medidas devem ser adotadas, como as preconizadas no manejo integrado da mancha-angular do algodoeiro. Dentre elas, a utilização de medidas voltadas para diminuir a pressão de inóculo no campo, como utilização de cultivares resistentes, destruição dos restos de cultura e rotação de culturas, além do uso de sementes saudáveis. Assim, a utilização do controle biológico por meio das bactérias *Bacillus subtilis* UFLA285, ALB629 e *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 pode ser uma ferramenta adicional no manejo integrado da mancha-angular, diminuindo a pressão de inóculo e, conseqüentemente, evitando surtos da doença e surgimento de novas raças do patógeno.

O isolado *Bacillus subtilis* UFLA285 se destacou no controle da mancha-angular, sendo estatisticamente superior em relação aos demais tratamentos pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ), com controle médio de 62,6% da doença. Os demais isolados, *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 (50,7%) e *B. subtilis* ALB629 (48,9%), proporcionaram controle estatisticamente semelhante ao do produto registrado para o controle da mancha-angular, ASM (46,5%). Resultados semelhantes no controle da mancha-angular foram obtidos em outros estudos. Arya & Parashar (2002a), utilizando o método de aplicação tratamento de sementes e pulverização foliar, verificaram que a melhor época de aplicação de *Bacillus* spp. na parte aérea das plantas de algodão foi 48 horas antes da inoculação de *Xam*, ocorrendo a proteção máxima das plantas contra a doença. Este isolado de *Bacillus* spp. inibiu também o crescimento *in vitro* de *Xam*, reduzindo o pH do meio de cultura (Arya & Parashar, 2002b).

Ishida et al. (2008) avaliaram o potencial de 123 isolados de rizobactérias na indução de resistência do algodoeiro à *Xam*, pelo método de

aplicação no solo, aos 14 dias antes da inoculação do patógeno. Os melhores isolados, dentre eles isolados do gênero *Bacillus* spp., apresentaram controle da mancha-angular do algodoeiro acima de 40% em relação à testemunha. Os isolados não apresentaram efeito inibitório direto *in vitro* a *Xam* e *Cgc*, além de não controlar a ramulose em relação à testemunha.

Outro método de controle da mancha-angular é via tratamento de sementes contaminadas com *Xam*. Mehta et al. (2005) testaram o fungicida tolyfluonid (1,20g/L água), por imersão das sementes em suspensão do fungicida, por 16 horas, para o controle da mancha-angular e observaram eficiência no controle da doença. Tolyfluonid é atualmente registrado no MAPA e recomendado por Andrei (2009) para o tratamento de sementes de algodão, visando ao controle do tombamento causado por *Cgc* e murcha-de-fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum*).

Portanto, aliado ao uso de cultivares resistentes, à rotação de culturas e a sementes saudáveis, o tratamento das sementes com bactérias benéficas, como *Bacillus subtilis* UFLA285, ALB629 e *Paenibacillus lentimorbus* MEN2, poderá ajudar a controlar a mancha-angular do algodoeiro.

Quanto à eficácia de ASM no controle de doenças de plantas, vários estudos foram realizados (Jesus Júnior et al., 1999; Romeiro et al., 1999; Castro et al., 2000, 2001; Maia et al., 2000; Oostendorp et al., 2001; Romero et al., 2001; Silva et al., 2001a,b, 2003a,b; Ishida et al., 2008a,b). No presente estudo, ASM foi pulverizado sete dias antes da inoculação, pois os mecanismos de indução de resistência a doenças requerem intervalo antes da inoculação com o patógeno desafiador. Também foram realizadas mais duas aplicações semanais após a primeira. A eficiência média de ASM no controle da bacteriose do algodoeiro em ensaios repetidos por dois anos consecutivos em condições de casa de vegetação foi de 45,6%. Silva et al. (2003a) verificaram redução da severidade da mancha-bacteriana do tomateiro, causada por *Xanthomonas*

*vesicatoria*, quando ASM foi aplicado 1 ou 3 dias antes da inoculação do patógeno. Em cacau, Resende et al. (2002) observaram que, para o controle de *Crinipellis pernicioso* e *Verticillium dahliae*, foram necessárias aplicações do ASM aos 30 e 15 dias antes da inoculação, respectivamente. Perez (2003) verificou, em condições de campo, o controle do mofo azul (*Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*) em plantas de fumo, bem como a redução de sintomas causados por *Cercospora nicotianae* e *Alternaria alternata*, quando as pulverizações de ASM (25 e 37,5 g i.a./ha) foram realizadas em intervalos de 10 dias. Quanto à variação de doses de ASM, Elmer (2006) observou um atraso no início dos sintomas de murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* em mudas de ciclâmen, por até três semanas, em relação à testemunha apenas inoculada.

Recentemente, Medeiros (2009) testou, em casa de vegetação e campo, os mesmos isolados antagonistas utilizados nos experimentos deste trabalho, porém, via tratamento de sementes visando ao controle do tombamento causado por *Cgc* e à mancha-angular causada por *Xam*, ambos patógenos transmitidos por sementes. Em campo, os isolados *B. subtilis* UFLA285 e *P. lentimorbus* MEN2 promoveram redução dos sintomas de tombamento em 45% e 56%, respectivamente, em relação à testemunha. Para o controle da mancha-angular em condições de casa de vegetação, os mesmos isolados reduziram a severidade da doença em 26% e 76% em relação à testemunha inoculada com o patógeno. Medeiros (2009) verificou, ainda, que a eficiência de *B. subtilis* UFLA285 na redução do tombamento de plântulas de algodão causado por *Rhizoctonia solani* AG4, tendo a resposta de controle ocorrido quando as plantas foram inoculadas aos nove dias após o plantio (DAP).

Estudando os mecanismos de ação do isolado no controle da doença por meio da análise da regulação de genes na interação planta-patógeno-antagonista, utilizando a técnica de microarranjo, Medeiros (2009) observou a alteração da

regulação de 246 genes, dentre os quais os relacionados à rota de indução de resistência sistêmica via jasmonato/etileno e à síntese de prolina e aquaporina, respostas relacionadas à osmorregulação. A aquaporina foi superexpressa em plantas tratadas com o antagonista e não submetidos a nenhum estresse e subexpressa em plantas infectadas com o patógeno.

Quanto à variável peso da matéria seca das plantas, observou-se, nos ensaios realizados para controle da mancha-angular, que o incremento médio proporcionado pelos isolados bacterianos de biocontrole de doenças foi de 60,2% em relação à testemunha inoculada. O melhor resultado foi obtido pelo tratamento com o isolado *P. lentimorbus* MEN2, que não diferiu estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), da testemunha absoluta, além de proporcionar aumento de 68,8% em relação à testemunha inoculada. Este isolado também proporcionou resultado satisfatório no controle da doença em 50,7%, não diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) com o ASM (Tabela 2). Para o patossistema algodão/*Cgc*, *P. lentimorbus* MEN2 não diferiu significativamente da testemunha. Entretanto, *B. subtilis* ALB629 se destacou entre os antagonistas, proporcionando incremento de altura significativamente superior ao da testemunha absoluta e 23,3% em relação à testemunha inoculada. As rizobactérias promotoras de crescimento PGPRs produzem fitormônios, como é o caso de isolados de *B. subtilis*, que produzem auxinas, giberelinas e citocininas (Tsavkelova et al., 2006), podendo estimular ou inibir o crescimento de raízes, dependendo de sua concentração (Persello-Cartieaux et al., 2003). Khalid et al. (2004), selecionando PGPRs na cultura do trigo, verificaram que o isolado que produziu maior quantidade de auxinas em solo não esterilizado também causou máximo de crescimento e produtividade na cultura, sugerindo que as auxinas sintetizadas por procariotos podem ser uma ferramenta de seleção de PGPRs.



O tratamento com ASM para o controle da mancha-angular e ramulose do algodoeiro comportou-se diferentemente para cada patossistema, quanto ao peso da matéria seca no final dos ensaios. No controle da mancha-angular, ASM não diferiu estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), da testemunha, para a variável peso da matéria seca. Entretanto, em ensaios visando ao controle da ramulose, houve diferença significativa pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) com a testemunha, porém, negativamente com redução do peso da matéria seca em 21,3% em relação à testemunha. Elmer (2006), utilizando a variação de doses de ASM no controle da murcha em ciclâmen (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*), observou redução linear do peso da matéria seca com o aumento da dose de ASM aplicado. Plantas não tratadas obtiveram peso da matéria seca superior aos demais tratamentos.

No controle da ramulose em condições de casa de vegetação, obteve-se redução de até 68,3% da AACPI em relação à testemunha, quando utilizado o tratamento de sementes e pulverização foliar com *B. subtilis* ALB629. Quanto aos resultados de campo, o mesmo isolado permaneceu como tratamento mais eficiente, com 22,9% de controle, juntamente com a combinação dos isolados *B. subtilis* ALB629 + *P. lentimorbus* MEN2 + *B. subtilis* UFLA285 (22,0%), além de possuir controle superior ao tratamento com fungicidas (13,1%).

Ishida et al. (2008) testaram isolados rizobacterianos para o controle da ramulose, mas não obtiveram sucesso no controle da doença em relação à testemunha, além de não apresentarem efeito inibitório direto *in vitro* a *Cgc*. Porém, o controle da ramulose foi eficiente no tratamento com ASM (10g i.a./100 L água) via pulverização foliar aos 14 dias antes da inoculação do patógeno, atingindo 80% em relação à testemunha. Nos ensaios realizados para o controle da ramulose em casa de vegetação, ASM também apresentou eficácia no controle da doença, com patamar de controle médio dos dois ensaios

realizados de 76,3% em relação à testemunha inoculada com o patógeno, não diferindo estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), de *B. subtilis* ALB629.

Em ensaio realizado em campo, Chitarra et al. (2007) observaram que ASM, isolado ou em combinação com o fungicida azoxystrobin, não diferiu, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05\%$ ), no controle da ramulose. Entretanto, os tratamentos com maiores dosagens de ASM foram os mais produtivos e, independentemente das dosagens, não interferiram na qualidade da fibra do algodão.

O fungicida piraclostrobin (estrubirulina) controlou a ramulose em 94,8% em condições de casa de vegetação. Esses dados são semelhantes aos resultados obtidos por Iamamoto & Silveira (2008), que observaram, em condições de campo, que os triazóis e estrobilurinas com triazóis apresentaram excelente controle sobre mancha-de-ramulária e ramulose. Quanto ao estudo do número de aplicações de piraclostrobin para o controle da ramulose em campo, Andrade Junior & Galbieri (2009) verificaram a necessidade de apenas uma pulverização com o fungicida para o controle da doença em cultivar resistente. Porém, em cultivar suscetível, foram necessárias três aplicações do fungicida para manter a ramulose em níveis aceitáveis. Nos ensaios de casa de vegetação realizados para este trabalho, duas aplicações de piraclostrobin, sete dias antes e após a inoculação ( $1,0 \times 10^6$  conídios/mL), reduziram a AACPI da ramulose em 94,8%, em relação à testemunha.

Para a produtividade do ensaio realizado em campo, os tratamentos fungicidas e mistura dos três isolados promoveram maior produtividade, 370,8 e 383,3 @/ha, respectivamente, em relação à testemunha água. Além do aumento da produtividade, a mistura dos três isolados proporcionou maior porcentagem de fibra na pluma de algodão e redução da AACPI da ramulose em relação à testemunha. Chitarra & Barbosa (2008), avaliando a eficiência de fungicidas triazóis, estrobilurinas e suas combinações no controle da ramulária, verificaram

que os tratamentos com quatro aplicações apresentaram produtividade média de 372,67 @/há, diferindo da testemunha.

As características físicas das fibras mais relevantes dependem do processo de fiação a ser utilizado, se a rotor ou a anel. Para ambos, as principais características de fibras são alongamento, cor, trash, comprimento, uniformidade de comprimento, resistência e micronaire (United States Department of Agriculture, 2001). Quanto à qualidade física da fibra de algodão dos tratamentos do ensaio de campo, as características de resistência (g/tex) e índice micronaire, proporcionadas pelo tratamento *B. subtilis* ALB629 + *B. subtilis* UFLA285, foram superiores ao tratamento com aplicações de fungicidas.

Devido ao sucesso de bactérias endosporogênicas no controle biológico de doenças do algodoeiro, como aumento da qualidade de fibras, além de características biológicas que permitem a viabilidade de sua formulação, trata-se de um antagonista com grande potencial para o manejo integrado de doenças do algodoeiro.

## 7 CONCLUSÕES

- 1) Todos os isolados testados foram eficazes para o controle da mancha-angular e da ramulose do algodoeiro, sugerindo um amplo espectro de ação contra fitopatógenos.
- 2) *Bacillus subtilis* UFLA285 proporcionou o maior controle da mancha-angular em casa de vegetação.
- 3) Para o controle da ramulose em casa de vegetação, os isolados testados apresentaram controle variando de 59% a 68%.
- 4) Não houve efeito aditivo das combinações de isolados para o controle da ramulose em casa de vegetação.
- 5) A combinação dos três isolados antagonistas proporcionou o maior controle da ramulose e maior produtividade no campo, além da maior porcentagem de fibra.
- 6) *Bacillus subtilis* ALB629 apresentou consistência de controle satisfatório da ramulose tanto em casa de vegetação quanto em campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JUNIOR, E.R.; GALBIERI, R. Influência do número de aplicações de fungicidas no controle de ramulose no algodoeiro em Primavera do Leste – MT. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.S83, ago. 2009. Suplemento.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas**: guia prática de produtos fitossanitários para uso agrícola. 8.ed. São Paulo: Ed. Andrei, 2009. 1378p.

ARAÚJO, A.E. **Deteção e transmissão planta-semente de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa**: efeito de níveis de incidência na semente e do controle químico da parte aérea sobre o progresso da ramulose do algodoeiro. 2008. 93p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ARYA, S.; PARASHAR, R.D. Biological control of cotton bacterial blight with phylloplane bacterial antagonists. **Tropical Agriculture**, Surrey, v.79, n.1, p.51-55, Jan. 2002a.

ARYA, S.; PARASHAR, R.D. Mechanisms of biological control of cotton bacterial blight by phylloplane antagonists. **Tropical Agriculture**, Surrey, v.79, n.1, p.56-60, Jan. 2002b.

BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; CASSETARI, L.S.; ALMEIDA, M.F. Efeitos do agente da ramulose sobre plantas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.S238, ago. 2009. Suplemento.

BEAUCHAMP, C.J. Mode of action of plant growth-promoting rhizobacteria and their potential use as biological control agents. **Phytoprotection**, Quebec, v.74, n.1, p.19-27, Apr. 1993.

BRANNEN, P.M.; KENNEY, D.S. Kodiak registered: a successful biological-control product for suppression of soil-borne pathogens of cotton. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v.19, n.3, p.169-171, Sept. 1997.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. Manejo de doenças do algodoeiro. In: NEFIT, D. **Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. cap.13, p.159-174.

CASTRO, R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; AZEVEDO, L.A.S. Efeito do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl na proteção contra doenças, incremento de produção e qualidade de frutos em tomate estaqueado. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.S492, ago. 2001 Suplemento.

CASTRO, R.M.; VIEIRA, M.; SCANAVACHI, V.; GUICHERIT, E. Redução na severidade de doenças e incremento da produção e qualidade dos frutos de tomate estaqueado em áreas comerciais através da aplicação do ativador de plantas acibenzolar-s-methyl. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.S324, ago. 2000. Suplemento.

CHITARRA, L.G. Qualidade ameaçada. **Revista Cultivar, Grandes Culturas**, Pelotas, ano 7, n.73, p.3-8, 2005.

CHITARRA, L.G.; BARBOSA, C.A.S. Controle químico da mancha de ramulária do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) no oeste da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Lavras: Tropical Plant Pathology, 2008. p.S155-S155.

CHITARRA, L.G.; RODRIGUES, S.M.M.; BETTINI, P.C.; MENEZES, V.L. Controle da ramulose do algodoeiro com uso de acibenzolar-S-methyl isolado e em mistura com fungicida. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.S195, ago. 2007. Suplemento.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.3, n.3, p.167-177, maio/jun. 1977.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, cap.8, p.41-52.

ELMER, W.H. Effects of acibenzolar-S-methyl on the suppression of Fusarium wilt of cyclamen. **Crop Protection**, Guildford, v.25, n.7, p.671-676, Sept. 2006.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedling. **Forest Science**, Lawrence, v.44, n.1, p.139-144, Jan. 1998.

ESITKEN, A.; KARLIDAG, H.; ERCISLI, F.; ULMER, G.M.B.H.; STUTTGART, C.O. Effects of foliar application of *Bacillus subtilis* Osu-142 on the yield, growth and control of shot-hole disease (*Coryneum blight*) of Apricot. **Gartenbauwissenschaft**, Stuttgart, v.67, n.4, p.139-142, Dec. 2002.

ESITKEN, A.; PIRLAK, L.; TURAN, M.; SAHIN, F. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. **Scientia**, Murfreesboro, v.110, n.4, p.324-327, Dec. 2006.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: software para análises estatísticas. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

GOULART, A.C.P. Doenças iniciais do algodoeiro: identificação e controle. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes**: qualidade fitossanitária. Viçosa, MG: UFV, 2005. cap.15, p.425-449.

HUANG, X.; ZHAI, J.; LUO, Y.; RUDOLPH, K. Identification of a highly virulent strain of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.122, n.4, p.461-469, Dec. 2008.

IAMAMOTO, M.M. **Doenças foliares do algodoeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

ISHIDA, A.K.N. **Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha-angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro**. 2004. 145p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, D.L.; POZZA, E.A. Rhizobacterium and acibenzolar-S-methyl (ASM) in resistance induction against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.1, p.27-34, jan./fev. 2008.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; VILAS-BOAS, C.H.; SOUZA, J.T. Rizobactérias no controle da mancha-angular do algodoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.1, p.149-156, jan./fev. 2008.

JESUS JUNIOR, W.C.; ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; PEREIRA, J.L.A. Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.S293, ago. 1999. Suplemento.

JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C. **Manejo integrado de doenças na cotonicultura brasileira**. Uberlândia: UFU, 2003. 142p.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.60, n.6, p.969-976, June 1970.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z.A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.96, p.473-480, 2004.

LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, n.3, p.448-453, 1987.

MAIA, C.B.; ROMEIRO, R.S.; LUSTOSA, D.C. Avaliação de fitotoxidez e efetividade de cibenzolar-s. methyl como indutor de resistência em tomateiro a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.S324, ago. 2000. Suplemento.

MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; DESTEFANO, S.A.L.; BERIAM, L.O.S.; PIZZINATTO, M.A.; CIA, E. Crestamento foliar, nova sintomatologia em algodoeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.34, n.2, p.168-171, abr./jun. 2008.

MCKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, n.1, p.195-218, Jan. 1923.

MEDEIROS, F.H.V. **Rhizobacteria for cotton seed treatment**: screening, field efficacy and molecular modes of action. 2009. 101p. Thesis (Doctor in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.



MEDEIROS, F.H.V.; SOUZA, R.M.; FERRO, H.M.; MEDEIROS, F.C.L.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, J.C.; SANTOS NETO, H.; SOARES, D.A.; ZANOTTO, E.; PARE, P.W. Bacillus spp. to manage seed-born Colletotrichum gossypii var. cephalosporioides damping-off. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, n.8, p.S102, Aug. 2008. Supplement.

MEHTA, Y.R.; BIBANCO, K.; ZANDONÁ, C.; LOPES, L.P.; ALVES, P.R.F.; CARLOS, M.M.; AGUIAR, P.; SEQUEIRO, F.; ZAMBOSI, T.S. Tolyfluanid como bactericida contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* transmitida por sementes de algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 5., 2005, Salvador. **Anais...** Salvador: UFBA, 2005. 1 CD-ROM.

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. **Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2004. 47p. (Circular Técnica, 76).

NASCIMENTO, A.R.P.; SILVA, Z.E.; SILVA, V.A.V.; AGUIAR, I.F.; SOUZA, G.S.C.; PAZ, C.D. Sensibilidade “in vitro” de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* a bactericidas e fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.S326-S327, ago. 2000. Suplemento.

OOSTENDORP, M.; KUNZ, W.; DIETRICH, B.; STAUB, T. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.107, n.1, p.19-28, Jan. 2001.

PENNA, J.C.V. Cultivares diferentes, lucro maior. **Cultivar**, Pelotas, v.2, n.17, p.32-36, jun. 2000.

PEREIRA, J.L.A.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, M.R. Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ao cobre. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.S328, ago. 2000. Suplemento.

PEREZ, L. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. **Crop Protection**, Guildford, v.22, n.2, p.405-413, 2003.

PERSELLO-CARTIEAUX, F.; NUSSAUME, L.; ROBAGLIA, C. Tales from the underground: molecular plant-rhizobacteria interactions. **Plant Cell Environment**, New York, v.26, n.2, p.186-199, Feb. 2003.

RESENDE, M.L.V.; NOJOSA, G.B.A.; CAVALCANTI, L.S.; AGUILAR, M.A.G.; SILVA, L.H.C.P.; PEREZ, J.O.; ANDRADE, G.C.G.; CARVALHO, G.A.; CASTRO, R.M. Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acybenzolar-S-methyl (ASM). **Plant Pathology**, Oxford, v.51, n.5, p.621-628, Oct. 2002.

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

ROMEIRO, R.S.; RODRIGUES, F.A.; JESUS JÚNIOR, W.C.; PEREIRA, J.L.A. Fitotoxidez e ativação de mecanismos de defesa de feijoeiro contra *X. campestris* pv. *phaseoli* de um derivado benzotiodiazólico. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, p.S255, ago. 1999. Suplemento.

ROMERO, A.M.; KOUSIK, C.S.; RITCHIE, D.F. Resistance to bacterial spot Bell pepper induced by acibenzolar-S-methyl. **Plant Disease**, Saint Paul, v.85, n.2, p.189-194, Feb. 2001.

SHANNER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v.70, n.8, p.1051-1056, Aug. 1977.

SIDHU, G.S.; WEBSTER, J.M. The use of aminoacid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v.11, n.2, p.117-127, Sept. 1977.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.S294, ago. 2001a. Suplemento.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, J.R.; KOBAYASTI, L.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CASTRO, R.M. Efeito do acibenzolar-s-metil (ASM) na proteção contra *Ralstonia solanacearum* em tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.S294, ago. 2001b. Suplemento.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V.; SOUZA, R.M.; CAMPOS, J.R. Avaliação comparativa do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* no tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.29, n.3, p.244-248, jul./set. 2003a.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V.; SOUZA, R.M.; CAMPOS, J.R.; CASTRO, A.M.S. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.29, n.2, p.177-181, abr./jun. 2003b.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Clifton, v.42, n.2, p.117-126, Feb. 2006.

## **CAPÍTULO 2**

**Controle de mofo-branco, mancha-de-alternária e podridão-das-maçãs por bactérias endosporogênicas, em campo comercial de produção de algodão**

## 1 RESUMO

Com a expansão da cotonicultura, houve o surgimento de novas doenças e até mesmo aquelas já conhecidas como secundárias no passado passaram a ter grande importância para a produção de algodão. A mancha-de-alternária possui importância secundária, podendo, em condições favoráveis, causar surtos epidêmicos no início do desenvolvimento das plantas no campo. O mofo-branco vem causando surtos epidêmicos em campos de produção de algodão em áreas que antecedem cultivos de soja, feijão e girassol. Outra doença de grande importância econômica é a podridão-das maçãs que, geralmente, não tem medidas de controle eficientes. Devido às dificuldades de controle das doenças citadas, há necessidade de desenvolverem-se novos métodos de controle que proporcionem o mínimo de impacto ao ambiente. Com o presente trabalho, objetivou-se avaliar o espectro de ação de três isolados endosporogênicos para o controle de doenças de ocorrência natural em campo de produção de algodão. Os tratamentos consistiram na aplicação dos antagonistas e suas respectivas combinações via tratamento de sementes e pulverizações. Todos os isolados avaliados foram eficazes no controle do mofo-branco, podridão-das-maçãs e mancha-de-alternária. *Bacillus subtilis* UFLA285 proporcionou controle de 81,8% do mofo-branco em relação à testemunha, enquanto, para o controle da podridão-das-maçãs, *Bacillus subtilis* ALB629 foi o mais eficiente com 58,3% de redução da incidência e *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 com 45,1% de controle da mancha-de-alternária do algodoeiro. Portanto, devido ao sucesso dos isolados bacterianos endosporogênicos no controle biológico de doenças do algodoeiro, sugere-se que ele têm grande potencial para o manejo integrado de doenças na cultura.

Palavras-chave: Controle biológico; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Gossypium hirsutum*; *Bacillus* spp.

## 2 ABSTRACT

As cotton production increases so does the emergence of new diseases, and even those already known to be secondary in the past have assumed greater importance in cotton production. The alternaria leaf spot has secondary importance and may under favorable conditions, cause epidemic outbreaks in the early development of plants in the field. White mold has caused epidemic outbreaks in fields of cotton production in areas prior to soybeans, beans and sunflower. Another disease of great economic importance is the cotton boll rot, which generally do not have effective control measures. Due to the difficulties of controlling the mentioned diseases, there is a need to develop new control methods that provide minimal impact to the environment. This study aimed at evaluating the broad activity of three sporogenic isolates for the control of naturally occurring diseases in cotton fields. The treatments consisted of application of the antagonists and their combination as seed treatment and spraying. All isolates were effective in controlling white mold, boll rot and alternaria leaf spot. *Bacillus subtilis* UFLA285 provided 81.8% control of white mold in relation to the control. While for the control of boll rot, *Bacillus subtilis* ALB629 was more efficient with 58.3% reduction in the incidence and *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 with 45.1% control of alternaria leaf spot. Therefore, due to the success of sporogenic bacterial isolates in biological control of cotton diseases, it is suggested that have great potential for integrated diseases management in crop.

Key words: Biological control; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Gossypium hirsutum*; *Bacillus* spp.

### 3 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, vem causando surtos epidêmicos em áreas que antecedem culturas hospedeiras do patógeno, como soja, feijão e girassol. Os sintomas de mofo-branco em algodoeiro são caracterizados por murcha de ramos e o patógeno infecta também as maçãs, dando-lhes aspecto de podridão de cor rósea (Miranda & Suassuna, 2004), gerando grandes perdas de produtividade. O patógeno produz estruturas de resistência, chamadas de escleródios, os quais podem permanecer viáveis no campo por mais de oito anos (Silva et al., 2009). Os escleródios são produzidos no interior ou no exterior da maçã colonizada e abaixo do córtex das hastes de plantas infectadas. As condições favoráveis ao patógeno são áreas com altitudes superiores a 800 m, onde predominam temperaturas noturnas amenas e formação de orvalho (Silva et al., 2009).

Outra doença de grande importância nos campos de produção de algodão do país, principalmente em regiões em que a alta precipitação pluviométrica coincide com o período de formação ou abertura de maçãs, é a podridão-das maçãs. Ela ocorre, principalmente, no cerrado, onde o período de formação das maçãs do baixeiro das plantas coincide com o período de maior precipitação pluviométrica (Araújo, 2008), além de serem utilizados plantios adensados. A podridão-das maçãs é resultado da ação de agentes patogênicos primários que podem induzir a atividade de um complexo de patógenos. Alguns insetos, como o bicudo (*Anthonomus grandis*) e percevejos (*Dysdercus* spp.), também provocam a porta de entrada para os microrganismos causadores da podridão-das maçãs (Araújo, 2008).

Estudos foram realizados com o uso de ASM para o controle da doença (Juliatti et al., 2001), além da seleção de cultivares resistentes (Lawrence et al., 2008; Ballaminut, 2009). Alguns estudos afirmam que a resistência de cultivares

à podridão-das maçãs está relacionada à arquitetura das plantas (Jones, 1982; Soomro et al., 2000) e ao espaçamento entre linhas, o que favorece a aeração e a incidência de raios solares.

A mancha-de-alternária em algodoeiro tem como agentes etiológicos duas espécies pertencentes ao gênero *Alternaria*. A mais comum é *Alternaria macrospora*, que afeta, principalmente, as folhas mais velhas, mas também pode incidir em folhas cotiledonares e maçãs. A outra espécie do gênero é *Alternaria alternata*, que também provoca lesões em folhas de algodoeiro, entretanto, com pouca importância econômica. Os sintomas da doença são pequenas manchas circulares de tonalidade marrom no centro e bordas enegrecidas, as quais evoluem para manchas maiores, que raramente ultrapassam 1 cm de diâmetro. Quando as lesões envelhecem, o centro torna-se seco e quebradiço, podendo causar perfurações no limbo foliar. Em cultivares suscetíveis, as lesões podem coalescer e formar áreas necróticas irregulares, culminando com a queda das folhas (Suassuna & Coutinho, 2007).

A mancha-de-alternária é uma doença que não tem ocorrido com grande severidade nas regiões tradicionalmente produtoras de algodão do semiárido, entretanto, quando há maior intensidade e frequência de chuvas, tem havido ocorrência de surtos epidêmicos. Algumas práticas culturais são recomendadas no manejo da doença, como modificação nos métodos e na frequência de irrigação, rotação de culturas, destruição de restos culturais e manejo da adubação (Suassuna & Coutinho, 2007).

O biocontrole de doenças do algodoeiro vem sendo estudado (Arya & Parashar, 2002; Ishida et al., 2008; Medeiros, 2009) com resultados promissores. Medeiros (2009) selecionou 3 dentre 368 isolados bacterianos formadores de endósporos provenientes de solo rizosférico e endofíticos de raízes de algodoeiro das principais regiões produtoras de algodão do Brasil, além de outros isolados provenientes de centros de pesquisas (Medeiros et al., 2008; Medeiros, 2009).



Os isolados selecionados como os mais eficientes para o controle do tombamento e da mancha-angular via tratamento de sementes infectadas foram: *Bacillus subtilis* ALB629 (Mars Center for Cocoa Science, Itajuípe, BA - Fábio C. Chaves), *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 (Universidade Federal Rural de Recife, Recife, PE – Rosa Mariano) e *Bacillus subtilis* UFLA285 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Ricardo Souza). Estes isolados também foram testados para o controle do tombamento em condições de campo, sendo significativamente superiores ao controle água e até mesmo ao tratamento fungicida, além de proporcionarem controles significativos de ramulose e mancha-angular em ensaios realizados em casa de vegetação nos anos 2007, 2008 e 2009 (Dados não publicados).

Uma vez observado o potencial desses isolados, com a realização do presente trabalho objetivou-se avaliar o espectro de ação dos mesmos no controle do mofo-branco, da podridão-das-maçãs e da mancha-de-alternária do algodoeiro em ocorrência natural no campo de produção comercial de algodão, na região de Presidente Olegário, MG, Brasil.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem, preservação e produção dos inóculos de *Bacillus* spp.

Para o ensaio, os isolados *B. subtilis* ALB629, *P. lentimorbus* MEN2 e *B. subtilis* UFLA285, preservados em peptona glicerol a -80°C (Lazo & Gabriel, 1987), foram transferidos para o meio de cultura ágar nutriente, pelo método de estrias paralelas e incubados, por 48 horas, a 28°C. Após o período de incubação, as células foram colhidas da superfície do meio, transferidas para meio caldo - nutriente e cultivadas, por 48 horas, em mesa agitadora orbital, a 150 rpm e a 28°C. Em seguida, a concentração de endósporos foi ajustada em câmara de Neubauer a  $10^8$  células/mL para o tratamento de sementes e aplicações foliares.

### 4.2 *Bacillus* spp. no controle do mofo-branco, mancha-de-alternária e podridão-das-maçãs do algodoeiro, em condições de campo

Os isolados de *Bacillus* spp. foram levados a condições de campo em área comercial de produção de algodão, situada na Fazenda Farroupilha, município de Presidente Olegário, MG, Brasil (987 m altitude, 18°05'21"S e 46°29'16"O). O solo da área experimental é Latossolo Vermelho Escuro e a correção do solo, a adubação no plantio e a cobertura foram realizadas de acordo com os resultados da análise química e física para a necessidade da cultura. O plantio foi realizado em dezembro de 2007 e o ensaio conduzido até a colheita, em agosto de 2008.

Para o ensaio de campo, utilizou-se a cv. Fiber Max 993 e o tratamento de sementes padrão da propriedade baseou-se na aplicação de carbofurano (Furadan; 1,5L p.c./100 Kg de sementes), thiamethoxam (Cruiser 600FS; 600mL p.c./100 kg semente), dietil-fosforotioato (Permit 500 DS; 1,2 Kg p.c./100 kg de semente), fludioxonil-metalaxil-M (Maxim XL; 100 mL p.c./100 kg de

sementes), carboxina-tiram (Vitavax, 800 mL p.c./100 kg de sementes) e cola (acetato de polivinila PVA 150mL/100 kg semente). A testemunha água consistiu na aplicação via tratamento de sementes de todos agroquímicos utilizados no tratamento padrão da fazenda, exceto os fungicidas.

Os isolados de *Bacillus* spp. foram multiplicados como descrito anteriormente e utilizados separadamente e em combinações para o tratamento de sementes, que consistiu na aplicação da suspensão bacteriana ( $10^8$  endósporos/mL), na dosagem de 1,2 L/100 kg de sementes e demais agroquímicos utilizados para o tratamento padrão da fazenda, exceto fungicidas. Durante o plantio, todas as parcelas do ensaio foram tratadas no sulco com carbofurano (Furadan 350 SC; 1L p.c./ha) e espalhante adesivo (SAG 0,015L) com vazão de 30L/ha.

A pulverização dos antagonistas ( $10^8$  endósporos/mL) sobre a parte aérea das plantas iniciou-se aos 30 dias após o plantio (DAP), acompanhando o intervalo das avaliações de incidência das doenças, aproximadamente 25 dias, até aos 138 DAP (Tabela 1). O tratamento padrão de fungicida do ensaio foi realizado de acordo com o manejo químico da fazenda para o controle de doenças na cultura (Tabela 2).

TABELA 1 Intervalos e número de aplicações via pulverização foliar de *Bacillus* spp. e avaliações no controle da mancha-de-alternária, mofo-branco e podridão-das-maçãs em algodoeiro.

| <b>APLICAÇÃO/AVALIAÇÃO</b> | <b>DAP*</b> |
|----------------------------|-------------|
| 1                          | 44          |
| 2                          | 69          |
| 3                          | 96          |
| 4                          | 118         |
| 5                          | 138         |

\*Dias após o plantio.

TABELA 2 Fungicidas utilizados para o controle das principais doenças foliares do algodoeiro ocorridas na Fazenda Farroupilha, safra 2007/08, com suas respectivas dosagens e dias de aplicação.

| <b>FUNGICIDAS</b>                                      | <b>DOSE (L/ha)</b> | <b>DAP</b> |
|--|--------------------|------------|
| Portero <sup>1</sup> (Carbendazim)                     | 0,6                | 45         |
| Priori-Xtra <sup>2</sup> (Azostrobina + Ciproconazol)  | 0,5                | 84         |
| Mertim <sup>3</sup> (Hidróxido de fentina)             | 0,6                | 121        |
| Priori-Xtra <sup>4*</sup> (Azostrobina + Ciproconazol) | 0,5                | 140        |

\*Aplicações de Priori-Xtra foram utilizadas óleo mineral Nimbus 0,2% v/v; Vazão: 200L/ha. <sup>1</sup>Benzimidazol; <sup>2</sup>Estrobilurina + Triazol; <sup>3</sup>Organicoestânico; <sup>4</sup>Estrobilurina + Triazol.

As plantas foram avaliadas quanto à incidência do mofo-branco, mancha-de-alternária e podridão-das-maçãs, doenças estas que surgiram naturalmente no campo. Foram amostradas, aleatoriamente, 10 plantas por linha

(1 planta/m) em cada avaliação de doenças, totalizando 30 plantas (3 linhas) por parcela útil. Na avaliação do mofo-branco, observou-se a incidência da doença nas plantas. Para a avaliação da podridão-das-maçãs, quantificaram-se a incidência de maçãs podres do baixeiro da planta e o número total de maçãs por planta avaliada para o cálculo da porcentagem de maçãs podres.

As pulverizações das suspensões dos antagonistas, fungicidas e inseticidas utilizados foram realizadas por atomizador de CO<sub>2</sub> acoplado com bicos do tipo cone vazio J4-2 e a pressão de trabalho constante de 30 lb/pol<sup>2</sup>, gerando uma vazão de 200 L/ha.

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, com 4 repetições por tratamento, tendo cada repetição sido representada por uma unidade experimental ou parcela. O tamanho das parcelas foi de 12 m de comprimento por 4,5 m de largura (5 linhas), com 8 sementes/m e espaçamento entre linhas de 0,90 m. Cada parcela útil constituiu-se em 3 linhas centrais de 10 m de comprimento.

A porcentagem de incidência de cada doença avaliada foi utilizada para o cálculo AACPI, proposto por Shaner & Finney (1977). Estes dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ), utilizando-se o software SISVAR (Ferreira, 2000).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Controle do mofo-branco em campo de produção de algodão

Dentre os tratamentos para o controle do mofo-branco em algodoeiro em condições de campo, todos diferiram significativamente da testemunha pelo teste Scott Knott ( $P < 0,05$ ), exceto *P. lentimorbus* MEN2 (Tabela 3).

TABELA 3 Eficiência dos antagonistas e suas respectivas combinações e de fungicidas no controle do mofo-branco em campo de produção de algodão.

| TRATAMENTOS                             | AACPI <sup>5</sup> |                | CONTROLE (%) <sup>6</sup> |
|---|--------------------|----------------|---------------------------|
| UFLA285 <sup>1</sup> +MEN2 <sup>2</sup> | 100,0              | a <sup>7</sup> | 81,8                      |
| UFLA285                                 | 100,0              | a              | 81,8                      |
| ALB629 <sup>3</sup> +UFLA285            | 200,0              | b              | 63,6                      |
| ALB629                                  | 250,0              | b              | 54,5                      |
| ALB629+MEN2+UFLA285                     | 300,0              | b              | 45,5                      |
| ALB629+MEN2                             | 300,0              | b              | 45,5                      |
| FUNG <sup>4</sup>                       | 300,0              | b              | 45,5                      |
| MEN2                                    | 450,0              | c              | 18,2                      |
| ÁGUA                                    | 550,0              | c              | -                         |
| CV (%) 28,9                             |                    |                |                           |

<sup>1</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>2</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>3</sup>ALB629: *Bacillus subtilis*; <sup>4</sup>FUNG: pyraclostrobin; <sup>5</sup>AACPI: Área abaixo da curva de progresso da incidência; <sup>6</sup>Porcentagem de controle da doença em relação à testemunha inoculada. <sup>7</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

O controle de mofo-branco proporcionado pelos isolados antagonistas variou de 18,2% a 81,8% em relação à testemunha água. A combinação *B. subtilis* UFLA285 + *P. lentimorbus* MEN2 e *B. subtilis* UFLA285, isoladamente, se destacou com o maior nível de controle do mofo-branco em relação à testemunha água, sendo significativamente superior ao tratamento com fungicidas. (Tabela 3).

## **5.2 Controle da podridão-das maçãs em campo de produção de algodão**

Plantas de algodoeiro tratadas com os isolados bacterianos apresentaram redução na incidência da podridão-das maçãs. Todos os tratamentos testados diferiram significativamente da testemunha água, pelo teste Scott-Knott ( $P < 0,05$ ) (Tabela 4).

TABELA 4 Eficiência de antagonistas e suas respectivas combinações e fungicidas no controle da podridão-de-maçãs de algodão em campo.

| TRATAMENTOS          | AACPI <sup>5</sup> |                | CONTROLE (%) <sup>6</sup> |
|----------------------|--------------------|----------------|---------------------------|
| ALB629 <sup>3</sup>  | 105,8              | a <sup>7</sup> | 58,3                      |
| ALB629+UFLA285       | 111,3              | a              | 56,1                      |
| UFLA285 <sup>1</sup> | 137,0              | b              | 46,0                      |
| ALB629+MEN2+UFLA285  | 148,5              | b              | 41,4                      |
| UFLA285+MEN2         | 153,6              | b              | 39,4                      |
| MEN2 <sup>2</sup>    | 169,7              | b              | 33,1                      |
| FUNG <sup>4</sup>    | 176,8              | b              | 30,3                      |
| ALB629+MEN2          | 206,0              | c              | 18,8                      |
| ÁGUA                 | 253,6              | d              | -                         |

CV (%) 12,6

<sup>1</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>2</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>3</sup>ALB629: *Bacillus subtilis*; <sup>4</sup>FUNG: pyraclostrobin; <sup>5</sup>AACPI: Área abaixo da curva de progresso da incidência; <sup>6</sup>Porcentagem de controle da doença em relação à testemunha inoculada. <sup>7</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

O controle da podridão-das-maçãs, proporcionado pelos isolados antagonistas, variou de 18,8% a 58,3%. As maiores reduções da AACPI da doença em relação à testemunha água foram proporcionadas pelo isolado *B. subtilis* ALB629 (58,3%) e pela combinação *B. subtilis* ALB629 + *B. subtilis* UFLA285 (56,1%), sendo estatisticamente superior ao tratamento fungicida,



utilizado como padrão da fazenda no manejo químico de doenças do algodoeiro (Tabela 4).

### 5.3 Controle da mancha-de-alternária em campo de produção de algodão

No controle da mancha-de-alternária, todos os tratamentos promoveram a redução da severidade da doença, diferindo significativamente da testemunha, exceto a combinação com os três isolados (Tabela 5).

TABELA 5 Eficiência de antagonistas e suas respectivas combinações e fungicidas no controle da mancha-de-alternária em campo de produção de algodão.

| TRATAMENTOS                               | AACPI <sup>5</sup>  | CONTROLE (%) <sup>6</sup> |
|---|---------------------|---------------------------|
| FUNG <sup>4</sup>                         | 35,1 a <sup>7</sup> | 60,7                      |
| MEN2 <sup>2</sup>                         | 49,0 b              | 45,1                      |
| ALB629 <sup>3</sup> +UFLA285 <sup>1</sup> | 56,3 c              | 37,0                      |
| ALB629                                    | 69,8 d              | 21,8                      |
| ALB629+MEN2                               | 72,3 d              | 19,0                      |
| UFLA285                                   | 76,4 d              | 14,4                      |
| UFLA285+MEN2                              | 81,6 e              | 8,6                       |
| ÁGUA                                      | 89,3 f              | -                         |
| ALB629+MEN2+ UFLA285                      | 124,6 g             | -                         |
| CV (%) 5,5                                |                     |                           |

<sup>1</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>2</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>3</sup>ALB629: *Bacillus subtilis*; <sup>4</sup>FUNG: pyraclostrobin; <sup>5</sup>AACPI: Área abaixo da curva de progresso da incidência; <sup>6</sup>Porcentagem de controle da doença em relação à testemunha inoculada. <sup>7</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste Scott-Knott (P<0,05).

O tratamento de maior eficiência no controle da doença foi proporcionado pelos fungicidas aplicado no manejo de doenças da fazenda (Tabela 2), com 60,7% de controle. Dentre os isolados, os melhores controles foram proporcionados por *P. lentimorbus* MEN2 e pela combinação *B. subtilis* ALB629 + *B. subtilis* UFLA285 com 45,1% e 37% de redução da incidência da mancha-de-alternária, respectivamente (Tabela 5).

## 6 DISCUSSÃO

Medeiros (2009) testou os isolados antagonistas utilizados neste trabalho, porém, via tratamento de sementes visando ao controle do tombamento causado por *Cgc* e da mancha-angular, causada por *Xam*, ambos patógenos transmitidos por sementes. Os isolados *B. subtilis* UFLA285 e *P.lentimorbus* MEN2 promoveram a redução dos sintomas de tombamento em 45% e 56%, respectivamente, em relação à testemunha. Para o controle da mancha-angular, os mesmos isolados reduziram a severidade da doença em 26% e 76% em relação à testemunha inoculada com o patógeno. Medeiros (2009) também verificou a eficiência de *B. subtilis* UFLA285 na redução do tombamento de plântulas de algodão, causado por *Rhizoctonia solani* AG4, tendo a resposta de controle ocorrido quando as plantas foram inoculadas aos nove dias após o plantio (DAP). Estudos da regulação gênica na interação planta-patógeno-antagonista, utilizando a técnica de microarranjo, revelou alteração de 246 genes, dentre os quais os relacionados à rota de indução de resistência sistêmica via jasmonato/etileno e à síntese de prolina e aquaporina, respostas relacionadas à osmorregulação. A aquaporina foi superexpressa em plantas tratadas com o antagonista e não submetidas a nenhum estresse e subexpressa em plantas infectadas com o patógeno (Medeiros, 2009).

Os antagonistas utilizados neste estudo controlaram o mofo-branco, causado por *Sclerotinia sclerotiorum*. Os controles mais eficazes ocorreram com o uso da combinação *B. subtilis* UFLA285 + *P. lentimorbus* MEN2, *B. subtilis* ALB629 + *B. subtilis* UFLA285 e *B. subtilis* UFLA285, isoladamente, com redução da AACPI do mofo-branco variando de 63,6% a 81,8% em relação à testemunha água. O tratamento com fungicidas reduziu a AACPI em 45,5% em relação à testemunha. No Brasil, não há registro, no MAPA, de produto para o controle de mofo-branco na cultura do algodoeiro (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários-AGROFIT, 2009), o que impede sua recomendação. No entanto,

agricultores utilizam os produtos recomendados para controle do mofo-branco em soja, como os fungicidas benzimidazóis (tiofanato metílico) e feniloiridinlaminas (fluazinam). O controle biológico com *Trichoderma* spp. também é utilizado, entretanto, os fungicidas citados inibem o antagonista fúngico. Portanto, somando-se este fato à alta eficiência de controle da doença, constata-se que os antagonistas bacterianos testados possuem grande potencial para serem utilizados no manejo integrado do mofo-branco na cultura do algodão. Outra vantagem da utilização desses isolados no controle do mofo-branco é a redução de inóculo para as próximas safras, visto que o patógeno produz estruturas de resistência que permanecem depositadas no solo.

O maior controle da mancha-de-alternária, 60,7%, foi proporcionado pelo tratamento com fungicidas. Entretanto, o tratamento com *P. lentimorbus* MEN2, bem como a combinação *B. subtilis* ALB629 + *B. subtilis* UFLA285, promoveu 45,1% e 37% de redução da incidência da doença, respectivamente. Como tática de manejo da mancha-de-alternária, recomenda-se o uso de cultivares resistentes, como, por exemplo, a 'CNPA 7H', além do controle químico (Suassuna & Coutinho, 2007). Aliada a essas táticas, a aplicação desses isolados bacterianos surge como uma alternativa adicional para o manejo da mancha-de-alternária em algodoeiro.

O uso de bactérias endosporogênicas no controle de doenças fúngicas em campo de produção de algodão também gerou sucesso na redução da incidência da podridão-das maçãs. Todos os tratamentos testados diferiram significativamente da testemunha água, exceto a combinação *B. subtilis* ALB629 + *P. lentimorbus*, com controle da doença variando de 18,8% a 58,3%. Juliatti et al. (2001), utilizando combinações de fungicidas com ASM para o controle de doenças fúngicas do algodoeiro, verificaram a redução da incidência da podridão de maçãs. Portanto, a aplicação de fungicidas reduz a pressão de inóculo de microrganismos oportunistas que podem colonizar ferimentos causados por

insetos (bicudo e percevejos). A mesma situação pode ser estendida ao controle de doenças do algodoeiro pelas bactérias endosporogênicas, em que os antagonistas reduzem a população de microrganismos oportunistas causadores da podridão-das-maçãs em caso de ferimentos e microclima favorável ao desenvolvimento da doença no baixeiro de plantas.

De acordo com Guthrie et al. (1994), compostos fenólicos relacionados à produção de antocianina têm sido indicados como responsáveis pela inibição do crescimento fúngico em tecidos de plantas de algodão. Portanto, a utilização de microrganismos que induzem a síntese desses compostos é bem-vinda, pois podem proporcionar o aumento da resistência do algodoeiro a doenças fúngicas. Devi & Reddy (2002) observaram que plantas de amendoim na presença de micorrizas e rizóbios tiveram um aumento no acúmulo de compostos fenólicos. Em outro estudo, Zdor & Anderson (1992) verificaram a acumulação de compostos fenólicos e fitoalexinas em cotilédones de feijão tratado com um isolado de *Pseudomonas putida* produtor de HCN. Portanto, as bactérias benéficas utilizadas neste estudo para o controle de doenças do algodoeiro podem estar relacionadas com o mecanismo de ação citado anteriormente para o controle de doenças.

Essa capacidade de controle de doenças proporcionada pelos isolados estudados também foi observada via tratamento de sementes de algodão para o controle do tombamento (*C. gossypii* var. *cephalosporioides* e *Rhizoctonia solani*) e mancha-angular (*X. axonopodis* pv. *malvacearum*) (Ferro et al., 2008; Medeiros et al., 2008; Medeiros, 2009). No controle de doenças do feijoeiro, os mesmos isolados bacterianos aplicados via tratamento de sementes foram eficientes na redução da severidade da murcha-de-curtobacterium (Martins et al., 2008) e crestamento bacteriano comum do feijoeiro (Zanotto et al., 2008).

Portanto, os isolados testados *B. subtilis* UFLA285, ALB629 e *P. lentimorbus* MEN2 possuem amplo espectro de ação.

## 7 CONCLUSÕES

- 1) Todos os isolados testados foram eficazes para o controle do mofo-branco, mancha-de-alternária e podridão-das maçãs do algodoeiro, sugerindo um amplo espectro de ação contra fitopatógenos.
- 2) *Bacillus subtilis* UFLA285 e a combinação de *B. subtilis* UFLA285 + *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 proporcionaram o maior controle do mofo-branco em algodoeiro.
- 3) *Bacillus subtilis* ALB629 e a combinação de *B. subtilis* ALB629 + *B. subtilis* UFLA285 proporcionaram o maior controle da podridão-das maçãs em algodoeiro.
- 4) *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 proporcionou maior controle da mancha-de-alternária do algodoeiro, dentre os isolados avaliados.
- 5) Não houve efeito aditivo das misturas de isolados para o controle das doenças do algodoeiro avaliadas em condições de campo.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, A.E. **Podridão de maçãs do algodoeiro**: principais causas e manejo. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2008. 22p. (Circular Técnica, 212).

ARYA, S.; PARASHAR, R.D. Biological control of cotton bacterial blight with phylloplane bacterial antagonists. **Tropical Agriculture**, Surrey, v.79, n.1, p.51-55, Jan. 2002.

BALLAMINUT, C. **A podridão de maçãs do algodoeiro**. Disponível em: <[http://www.200.164.229.147:8080/portal\\_algodao](http://www.200.164.229.147:8080/portal_algodao)>. Acesso em: 12 set. 2009.

BELTRÃO, N.E.M. Bom negócio para o Nordeste. **Cultivar**, Pelotas, v.8, n.8, p.19-20, ago. 1999.

BURKLE, R.; MEHTA, Y.R.; FONSECA, N. Reação de cultivares de algodoeiro a *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.25, n.3, p.91-94, jul./set. 1999.

CHAKRABARTY, P.K.; DUAN, Y.P.; GABRIEL, D.W. Cloning and characterization of a member of the *Xanthomonas avr/pth* gene family that evades all commercially utilized cotton R genes in the United States. **Phytopathology**, Saint Paul, v.87, n.11, p.1160-1167, Nov. 1997.

DEVI, M.C.; REDDY, M.N. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogea* L.) plants inoculated with VAM fungus and Rhizobium. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v.37, n.2, p.151-156, June 2002.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: software para análises estatísticas. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

FERREIRA, J.H.S.; MATTHEE, F.N.; THOMAS, A.C. Biological control of *Eutypa lata* in grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.81, n.3, p.283-287, Mar. 1991.

FERRO, H.M.; SOUZA, R.M.; MEDEIROS, F.H.V.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, J.C.; SOARES, D.A.; SANTOS NETO, H.; ZANOTTO, E.; DORNELAS, G.A. *Bacillus* spp. para o tratamento de sementes de algodão contaminadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.34, p.S97, ago. 2008. Suplemento.

GUTHRIE, D.; WHITAN, K.; BATSON, B.; CRAWFORD, J.; JIVIDEN, G. Podridão de maçãs. **Cotton Physiology Today**, Washington, v.5, n.8, p.1-4, Sept. 1994.

IAMAMOTO, M.M.; SILVEIRA, C. Efeito de fungicidas no complexo de doenças do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, p.S98, fev. 2008. Suplemento.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; VILAS-BOAS, C.H.; SOUZA, J.T. Rizobactérias no controle da mancha angular do algodoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.1, p.149-156, jan./fev. 2008.

JONES, J.E. The present state of the art and science of cotton breeding for leaf morphological types. In: BELTWISE COTTON RESEARCH CONFERENCE, 1., 1982, Las Vegas. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1982. p.92-99.

JULIATTI, F.C.; DUARTE, R.P.; FREITAS, P.T. Acil benzolar (Bion) em combinação com fungicidas no controle da mancha de ramulária, ferrugem e podridão de maçãs, efeito na produtividade e qualidade das fibras do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3., 2001, Goiânia. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão; Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2001. 1 CD-ROM.

LAWRENCE, K.S.; MONKS, D.C.; DELANEY, D.; GLASS, K.; PEGUES, M.D.; COAST, G. **Boll rot and hard lock of cotton project report 2006**. Disponível em: <<http://www.aces.edu>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, n.3, p.448-453, Mar. 1987.

MARTINS, S.J.; SOUZA, R.M.; FERRO, H.M.; MEDEIROS, F.H.V.; SANTOS NETO, H.; ZANOTTO, E.; ZACARONI, A.B. Tratamento de sementes no manejo da murcha de *Curtobacterium* do feijoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, p.S99, ago. 2008. Suplemento.

MEDEIROS, F.H.V. **Rhizobacteria for cotton seed treatment**: screening, field efficacy and molecular modes of action. 2009. 101p. Thesis (Doctor in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.



MEDEIROS, F.H.V.; SOUZA, R.M.; FERRO, H.M.; MEDEIROS, F.C.L.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, J.C.; SANTOS NETO, H.; SOARES, D.A.; ZANOTTO, E.; PARE, P.W. *Bacillus* spp. to manage seed-born *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* damping-off. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, n.8, p.S102, Aug. 2008. Supplement.

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. **Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2004. 47p. (Circular Técnica, 76).

SHANER, G.; FINNEY, R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox Wheat. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v.67, n.8, p.1051-1056, 1977.

SILVA, L.H.C.P.; CAMPOS, H.D.; SILVA, J.R.C. Manejo do mofo-branco da soja. In: NEFIT, C. **Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. cap.17, p.205-214.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Consulta de produtos comerciais**. Disponível em:  
<[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso: 20 set. 2009.

SOOMRO, A.R.; SOOMRO, A.W.; MALLAH, G.H.; MEMON, A.M.; SOOMRO, A.H.; KALHORO, A.D. Okra leaf cotton and its utilization in Sindh. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v.3, n.1, p.188-190, 2000.

SUASSUNA, N.D.; COUTINHO, W.M. Manejo das principais doenças do algodoeiro no cerrado brasileiro. In: FREIRE, E.C. (Org.). **Algodão no cerrado do Brasil**. Brasília: Associação Brasileira dos Produtores de Algodão, 2007. p.479-521.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **The classification of Cotton**. Washington, 2001. 22p.

ZANOTTO, E.; SOUZA, R.M.; FERRO, H.M.; MEDEIROS, F.H.V.; SANTOS NETO, H.; MARTINS, S.J.; ZACARONI, A.B. *Bacillus* spp. no tratamento de sementes de feijão para controle do crestamento bacteriano comum. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 41., 2008, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2008. 1 CD-ROM.

ZDOR, R.; ANDERSON, A. Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of bean. **Plant & Soil**, The Hague, v.140, n.1, p.99-107, Feb. 1992.

## **CAPÍTULO 3**

**Métodos de aplicação de bactérias endosporogênicas no controle da ramulose, mancha-angular e podridão-das-maçãs do algodoeiro**

## 1 RESUMO

Isolados de bactérias endoesporegênicas foram previamente selecionados para o controle do tombamento e da mancha-angular do algodoeiro via tratamento de sementes infectadas. Uma vez observado o potencial desses isolados no controle de doenças causadas por patógenos transmitidos por sementes, o presente trabalho objetivou avaliar métodos de aplicação desses antagonistas no controle da mancha-angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) e ramulose (*Colletotrichum gossypium* var. *cephalosporioides*) em casa de vegetação e ramulose e podridão-das-maçãs em condições de campo. Para os ensaios de casa de vegetação, realizaram-se três aplicações dos isolados antagonistas. Dentre os métodos de aplicação dos antagonistas, realizaram-se o tratamento de sementes + pulverização foliar semanal, tratamento de sementes + suplementação do substrato semanalmente e apenas pulverização foliar semanal. Avaliaram-se a incidência para ramulose e severidade para mancha-angular aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. No ensaio de campo, os tratamentos consistiram na aplicação dos antagonistas e suas respectivas combinações via tratamento de sementes e pulverizações. As pulverizações iniciaram-se aos 30 dias após o plantio, acompanhando o intervalo das avaliações de doenças. Todos os isolados avaliados foram eficazes no controle da mancha-angular, ramulose e podridão-das-maçãs do algodoeiro. Em ensaios de casa de vegetação, todos os métodos de aplicação dos antagonistas foram eficazes no controle da mancha-angular do algodoeiro. ASM e *Bacillus* spp. UFLA401 não diferiram quanto ao método de aplicação no controle da ramulose, proporcionando controle médio de 68,5% e 56,6%, respectivamente. Nos ensaios de campo, o melhor método de aplicação dos antagonistas foi o tratamento de sementes + duas pulverizações, com o controle da ramulose variando de 26,8% a 56,6% e *Bacillus subtilis* UFLA285 não diferiu quanto ao método de aplicação e ao número de aplicação, com controle médio de 67,4% da podridão-das-maçãs.

Palavras-chaves: *Bacillus* spp.; *Gossypium hirsutum*; Controle biológico

## 2 ABSTRACT

Sporogenic bacterial isolates were previously selected for the control of damping off and cotton bacterial blight through treatment of infected seeds. As noted the potential of these isolates in the control of diseases caused by pathogens transmitted by seed, this study aimed to evaluate methods of application of these antagonists in the control of cotton bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) and ramulosis (*Colletotrichum gossypium* var. *cephalosporioides*) in greenhouse and ramulosis and boll rot in the field. For the trials from greenhouse were realized three applications of antagonistic isolates. Among the methods of application of the antagonists, there was seed treatment + foliar spray weekly, seed treatment and supplementation of the substrate every week and just spray weekly. We evaluated the incidence to ramulosis and severity to cotton bacterial blight to 7, 14, 21 and 28 days after inoculation. In the field trial, the treatments consisted of application of the antagonists and their combination as seed treatment and spraying. The spraying began at 30 days after planting, following the range of evaluations of disease. All isolates were effective in the control of bacterial blight, ramulosis and boll rot in cotton. In greenhouse, all methods of antagonist application s were effective in controlling cotton bacterial blight, ASM and *Bacillus* spp. UFLA401 did not differ in the method of application in the control of ramulosis, providing control average of 68.5 and 56.6%, respectively. In field trials, the best method of application of the antagonists was the seed treatment + 2 sprays in control of ramulosis ranged from 26.8 to 56.6%, and *Bacillus subtilis* UFLA285 did not differ in the method of application and number application, with average control of 67.4% of the boll rot.

Key words: *Bacillus* spp.; *Gossypium hirsutum*; Biocontrol

### 3 INTRODUÇÃO

A cotonicultura é, hoje, uma das áreas em que mais se investe em tecnologia. As inovações tecnológicas criaram um novo modelo produtivo, com extensas áreas de plantio e mecanização da lavoura desde o plantio até a colheita. A implantação da lei de proteção de cultivares contribuiu para o aumento de investimentos em qualidade de fibra, melhorando o produto interno e a articulação com o comércio exterior. Além disso, ocorreram o fortalecimento e o crescimento da indústria têxtil no país. Acompanhando toda a revolução tecnológica, novas doenças e, até mesmo, aquelas já conhecidas e que não eram prejudiciais no passado, manifestam-se, trazendo grandes desafios à produção (Penna, 2000).

A ramulose é frequentemente observada em campos de produção associada a perdas quantitativas na cultura do algodoeiro (Cassetari Neto & Machado, 2005). Possui como agente etiológico o fungo *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*, o qual pode ser transmitido por sementes (Goulart, 2005), além de sobreviver nos restos de cultura (Araújo, 2008a). Uma vez introduzida na área, sob condições favoráveis ao seu progresso, a doença é rapidamente transmitida às plantas vizinhas, que apresentam, inicialmente, lesões necróticas que evoluem para perfurações no limbo em forma de estrela. Com o progresso da doença, o fungo causa encurtamento de internódios e envassouramento, inviabilizando a produção da planta infectada com perdas de produção variando de 38% a 75%, em função das condições ambientais, das variedades e das técnicas utilizadas no manejo (Cassetari Neto & Machado, 2005).

A podridão-das-maçãs é outra importante doença encontrada nos campos de produção de algodão. Ocorre, principalmente, no cerrado, onde o período de maior precipitação pluviométrica coincide com o de formação das maçãs do

baixeiro das plantas (Araújo, 2008b), além da utilização de plantios adensados. A podridão-das-maçãs é causada por um complexo de microrganismos oportunistas que colonizam sintomas causados por patógenos primários. Alguns insetos, como o bicudo (*Anthonomus grandis*) e o percevejo (*Dysdercus* spp.), também provocam portas de entrada para esses microrganismos (Araújo, 2008b).

Para o controle da podridão-das-maçãs, estudos foram realizados com o uso de ASM (Juliatti et al., 2001), além da seleção de cultivares resistentes (Lawrence et al., 2008; Ballaminut, 2009). Pesquisas revelaram que a resistência de cultivares à podridão-das-maçãs está relacionada à arquitetura das plantas (Jones, 1982; Soomro et al., 2000) e ao espaçamento entre linhas, o que favorece a aeração e a incidência de raios solares.

A mancha-angular do algodoeiro é uma importante bacteriose que tem como agente etiológico *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam), a qual pode ser transmitida via sementes contaminadas, ocorrendo de forma generalizada sobre a cultura no cerrado brasileiro (Chitarra et al., 2005). A disseminação do patógeno na lavoura ocorre pelos respingos de água acompanhados de ventos fortes (Miranda & Suassuna, 2004), podendo ser responsável por grandes danos econômicos, devido à sua rápida disseminação e difícil controle (Chitarra et al., 2005). É potencialmente destrutiva em condições ambientais favoráveis à infecção e à disseminação (alta umidade relativa do ar, precipitação pluviométrica e altas temperaturas), levando a perdas significativas na produção (Miranda & Suassuna, 2004). Os sintomas em folhas de algodão, após a colonização pela fitobactéria, são lesões angulares, delimitadas pelas nervuras secundárias e terciárias, inicialmente de aspecto úmido (encharcado) de coloração verde e oleosa, tornando-se, posteriormente, parda e necrosada (Miranda & Suassuna, 2004). O patógeno também pode ser encontrado nas maçãs, causando manchas de coloração verde e de aspecto oleoso, deprimidas na

parte central e que, geralmente, são colonizadas por fungos causadores de podridões (Cia, 1977; Yamamoto, 2003; Araújo, 2008a). Em cultivares suscetíveis, observam-se lesões necróticas nos pecíolos das folhas, no pedúnculo das maçãs e na haste principal das plantas infectadas com o patógeno (Juliatti & Polizel, 2003; Chitarra, 2005). Recentemente, observou-se, no estado de São Paulo, uma nova sintomatologia causada por *Xam*, denominada de crestamento foliar, pois, geralmente, é acompanhada de halo clorótico, além de sintomas em forma de “V” invertido a partir dos bordos foliares (Malavolta et al., 2008).

O biocontrole de doenças do algodoeiro vem sendo estudado (Arya & Parashar, 2002; Ishida et al., 2008a; Medeiros, 2009) com resultados promissores. Medeiros (2009) selecionou 2 dentre 368 isolados bacterianos formadores de endósporos provenientes de solo rizosférico e endofíticos de raízes de algodoeiro das principais regiões produtoras de algodão do Brasil, além de outros isolados provenientes de centros de pesquisas (Medeiros et al., 2008; Medeiros, 2009). Os isolados selecionados como os mais eficientes para o controle do tombamento e da mancha-angular via tratamento de sementes infectadas foram *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 (Universidade Federal Rural de Recife, Recife, PE – Rosa Mariano) e *Bacillus subtilis* UFLA285 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Ricardo Souza), em casa de vegetação. Posteriormente, esses isolados foram testados para o controle do tombamento via tratamento de sementes em campo comercial de produção de algodão, sendo significativamente superiores ao controle água e, até mesmo, ao fungicida. Uma vez observado o potencial desses isolados no controle de doenças causadas por patógenos transmitidos por sementes, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar métodos de aplicação desses antagonistas e de *Bacillus* spp. UFLA401 (Ferro et al., 2008) no controle da mancha-angular e ramulose em casa de vegetação, ramulose e podridão-das-maçãs do algodoeiro, em condições de campo.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem, preservação e produção de inóculo

#### Isolados de *Bacillus* spp.

Os isolados selecionados por Medeiros (2009) como os mais eficientes para o controle do tombamento e mancha-angular via tratamento de sementes infectadas foram utilizados neste estudo visando ao controle de doenças da parte aérea do algodoeiro. Os antagonistas selecionados foram *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 (Universidade Federal Rural de Recife, Recife, PE – Rosa Mariano), *Bacillus subtilis* UFLA285 e *Bacillus* spp. UFLA401 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG – Ricardo Souza).

A cada ensaio e em suas épocas de aplicação, os isolados preservados em peptona glicerol a -80°C (Lazo & Gabriel, 1987) foram transferidos para o meio de cultura ágar nutriente pelo método de estrias paralelas e incubados, por 48 horas, a 28°C. Após o período de incubação, as células foram colhidas da superfície do meio e transferidas para meio caldo-nutriente e cultivado, por 48 horas, em mesa agitadora orbital, a 150 rpm, e a 28°C. Em seguida, a concentração de endósporos foi ajustada em câmara de Neubauer a 10<sup>8</sup> células/mL para tratamento de sementes e aplicações foliares ou irrigação do substrato.

#### Patógenos

O isolado de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (Cgc), obtido da micoteca do Laboratório de Patologia de Sementes (DFP-UFLA), foi cultivado em meio batata dextrose ágar (BDA) e incubado, a 25°C, por 10 dias. Em seguida, foi preparada uma suspensão de conídios em solução salina (0,85%) e ajustada em câmara de Neubauer, na concentração de 10<sup>6</sup> conídios/mL para inoculação em plantas de algodão sob condições de casa de vegetação.

O isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (Xam) IB1153 é proveniente da coleção de fitobactérias do Instituto Biológico de Campinas, SP. Para uso experimental, IB1153, preservado em peptona glicerol, a -80°C (Lazo & Gabriel, 1987) e em folhas herborizadas no Laboratório de Bacteriologia DFP/UFLA, foi repicado para meio 523 (Kado & Heskett, 1970), pelo método de estrias paralelas e incubado, por 48 horas, a 28°C. Em seguida, foi transferido para meio 523 líquido e levou-se à mesa orbital agitadora, a 100 rpm, por 24 horas, a 28°C. Posteriormente, 100 µL da suspensão foram pipetados em meio 523, espalhados com alça de Drigalsky estéril e incubados, por 48 horas, a 28°C. Em seguida, preparou-se a suspensão bacteriana em solução salina (0,85%), ajustando-se à concentração de 10<sup>8</sup> ufc/mL em espectrofotômetro de luz ( $A_{520} = 0,7$ ) para inoculação em plantas de algodão sob condições de casa de vegetação.

#### **4.2 *Bacillus* spp. no controle da ramulose e mancha-angular sob condições de casa de vegetação**

Os isolados de *Bacillus* spp. e *Paenibacillus lentimorbus*, descritos anteriormente, foram testados em ensaios por dois anos consecutivos (2008 e 2009), em condições de casa de vegetação, para o controle da ramulose e da mancha-angular do algodoeiro. Os ensaios foram realizados em casa de vegetação da Universidade Federal de Lavras, DFP/UFLA, em Lavras, MG, Brasil (915 m altitude, 21°13'34''S e 44°58'31''O).

### **Métodos de aplicação dos antagonistas**

Para os ensaios de casa de vegetação, realizaram-se três aplicações dos isolados antagonistas, independentemente do método de aplicação. A primeira aplicação ocorreu aos sete dias antes da inoculação; a segunda, um dia após a inoculação e a terceira, aos sete dias após a inoculação do patógeno. Dentre os métodos de aplicação dos antagonistas, realizaram-se a pulverização semanal da parte aérea das plantas, o tratamento de sementes antes da semeadura e a pulverização semanal da parte aérea das plantas, além do tratamento de sementes e suplementação do substrato semanalmente, visando avaliar a redução da doença por uma possível indução de resistência.

### **Controle da ramulose do algodoeiro**

Em todos os ensaios realizados para o controle da ramulose, utilizou-se a cultivar Deltaopal, considerada muito suscetível (Cia & Salgado, 2005). As sementes foram microbiolizadas com os antagonistas citados anteriormente, na dosagem de 2 mL/g de semente previamente desinfestada (NaClO 2% a 2 minutos), secas ao ar à temperatura ambiente por 12 horas e, em seguida, semeadas em vasos de 5 litros contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Assim que as plantas atingiram o estágio de primeira folha definitiva expandida (21 dias após o plantio e 7 dias antes da inoculação de *Cgc*), os antagonistas foram pulverizados semanalmente na parte aérea até o escorrimento ou aplicados no substrato (5mL/planta), totalizando três aplicações. Como testemunha de controle da ramulose, utilizou-se o fungicida pyraclostrobin (3mL i.a./L), aplicado uma semana antes e após a inoculação de *Cgc* nas plantas. Também foram utilizadas as testemunhas acibenzolar-S-metil (7,5g i.a/100L água) e água, acompanhando as épocas e os intervalos de aplicação dos antagonistas descritos anteriormente.

A inoculação de *Cgc* foi realizada aos 7 dias após a primeira aplicação dos tratamentos, referente a 28 dias após emergência (DAE), pela pulverização das plantas até escorrimento com uma suspensão de  $10^6$  conídios/mL. Essa época de inoculação refere-se ao estágio V2, estágio fenológico mais apropriado para a inoculação de *Cgc* em plantas de algodão (Barrocas et al., 2009). Fez-se câmara úmida das plantas 24 horas após a inoculação. As plantas foram avaliadas quanto à incidência de lesões em folhas aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação do patógeno.

### **Controle da mancha-angular do algodoeiro**

Nos ensaios realizados para verificar o controle da mancha-angular por meio da utilização de isolados bacterianos endosporogênicos, utilizou-se a cultivar Acala 90, considerada muito suscetível à bacteriose. As sementes foram microbiolizadas com os antagonistas citados anteriormente na dosagem de 2 mL/g de sementes previamente desinfestadas (NaClO 2% a 2 min), secas ao ar à temperatura ambiente, por 12 horas e, em seguida, semeadas em vasos de 5 litros contendo substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Assim que as plantas atingiram o estágio de primeira folha definitiva expandida (21 dias após o plantio e 7 dias antes da inoculação de *Xam*), os antagonistas foram pulverizados semanalmente na parte aérea até o escorrimento ou aplicados no substrato (5mL/planta), totalizando três aplicações. Como testemunha de controle da mancha-angular, utilizou-se oxicloreto de cobre (2g/mL) aplicado uma semana antes e após a inoculação de *Xam*. Também foram utilizadas as testemunhas acibenzolar-S-metil (7,5g i.a/100L água) e água, acompanhando as épocas e os intervalos de aplicação dos antagonistas.

A inoculação de *Xam* também foi realizada aos 7 dias após a primeira aplicação dos tratamentos (28 DAP) pela pulverização das plantas até escorrimento com uma suspensão de  $10^8$  ufc/mL. Fez-se câmara úmida das

plantas 24 horas antes e 24 horas após a inoculação. As plantas foram avaliadas quanto à severidade da mancha-angular aos 7, 14, 21 e 28 dias após a inoculação de *Xam*, de acordo com a escala de Sidhu & Webster (1977) adaptada por Ishida (2004), em que 0 = 0% de área foliar lesionada; 1 = de 1% a 25% de área foliar lesionada; 2 = de 26% a 50% de área foliar lesionada; 3 = de 51% a 75% de área foliar lesionada e 4 = acima de 76% de área foliar lesionada.

### **Promoção de crescimento**

Avaliou-se o peso da matéria seca, sendo esta relacionada à promoção de crescimento de plantas. Após a última avaliação da severidade da doença, as partes áreas das plantas foram coletadas e acondicionadas em estufa com circulação de ar quente para secagem do material até o peso constante. As médias de peso seco foram comparadas à testemunha inoculada com o patógeno.

### **4.3 *Bacillus* spp. no controle da ramulose e da podridão-das-maçãs do algodoeiro, em condições de campo**

Os isolados de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus*, avaliados em condições de casa de vegetação para o controle da ramulose e mancha-angular do algodoeiro, foram levados para condições de campo em área comercial de produção de algodão, a fim de avaliar seu efeito sobre a ramulose e a podridão-de-maçãs, ocorridas na safra 2008/2009. O ensaio situou-se na Fazenda Farroupilha, município de Presidente Olegário, MG, Brasil (987m altitude, 18°05'21"S e 46°29'16"O). O solo da área experimental é um Latossolo Vermelho-Escuro, tendo a correção do solo, a adubação no plantio e a cobertura sido realizadas de acordo com os resultados da análise química e física do solo para a necessidade da cultura. O plantio foi realizado em dezembro de 2008 e o ensaio conduzido até a colheita, em agosto de 2009.

Quanto à forma de aplicação dos antagonistas, realizaram-se dois métodos de aplicação para cada isolado testado. O primeiro método de aplicação consistiu somente na aplicação do antagonista via tratamento de sementes, como descrito anteriormente. Já o segundo método de aplicação consistiu no tratamento de sementes e na pulverização da parte aérea, tendo sido avaliado o número de aplicações dos antagonistas no controle das doenças do algodoeiro. Os intervalos das pulverizações foram de 30 dias.

Os isolados de *Bacillus* spp. foram multiplicados como descrito anteriormente e utilizados separadamente e em combinações, para o tratamento de sementes. Esse tratamento consistiu na aplicação da suspensão bacteriana ( $10^8$  endósporos/mL), na dosagem de 1,2 L/100 kg de sementes e demais agroquímicos utilizados para o tratamento padrão da fazenda, exceto fungicidas. Durante o plantio, todas as parcelas do ensaio foram tratadas no sulco de plantio com carbofurano (Furadan 350 SC; 1L p.c./ha) e espalhante adesivo (SAG 0,015L), com vazão de 30L/ha.

Utilizou-se a cultivar Deltaopal, tendo o tratamento de sementes padrão da propriedade se baseado na aplicação de carbofurano (Furadan; 1,5L p.c./100 kg de sementes), thiamethoxam (Cruiser 600FS; 600mL p.c./100 kg semente), dietil-fosforotioato (Permit 500 DS; 1,2 Kg p.c./100 kg de semente), fludioxonil-metalaxil-M (Maxim XL; 100 mL p.c./100 kg de sementes), carboxina-tiram (Vitavax, 800 mL p.c./100 kg de sementes) e cola (acetato de polivinila PVA 150mL/100 kg semente). A testemunha água consistiu na aplicação via tratamento de sementes de todos agroquímicos utilizados no tratamento padrão da fazenda, exceto os fungicidas.

As plantas foram avaliadas quanto à incidência da ramulose e de podridão-das-maçãs. Amostraram-se, aleatoriamente, 10 plantas por linha (1 planta/m) em cada avaliação de doenças, totalizando 30 plantas (3 linhas) por parcela útil. A avaliação da incidência da ramulose consistiu na observação de

sintomas típicos da doença em folhas presentes nos dois últimos entrenós superiores da haste principal da planta de algodão. Quanto à avaliação da podridão-das-maçãs, quantificaram-se a incidência de maçãs podres do baixeiro da planta e o número total de maçãs por planta avaliada, sendo calculada a porcentagem de maçãs podres.

A pulverização, tanto das suspensões dos antagonistas quanto de outros agroquímicos utilizados para o manejo de pragas, foi realizada por atomizador de CO<sub>2</sub> acoplado com bicos do tipo cone vazio J4-2 e à pressão de trabalho constante de 30 lb/pol<sup>2</sup>, gerando uma vazão de 200 L/ha.

Ao término do ensaio, foi avaliada a produtividade de algodão em caroço em kg/tratamento e extrapolado para arroba/ha, de acordo com o espaçamento entre linhas utilizado. Também foram realizadas amostragens da produção de cada parcela e enviadas para o Centro Nacional de Pesquisa em Algodão – Embrapa Algodão (Campina Grande, PB, Brasil) para a análise da qualidade das características físicas da fibra de algodão.

#### **4.4 Delineamento, tamanho das parcelas e análise estatística**

##### **Ensaio de casa de vegetação**

O delineamento experimental para os ensaios de casa de vegetação foi em blocos ao acaso, em esquema fatorial 4x3+3, sendo 3 isolados de *Bacillus* spp. e ASM x 3 métodos de aplicação + 3 testemunhas (testemunha absoluta, testemunha inoculada e pyraclostrobin ou oxicloreto de cobre), com 4 repetições por tratamento, tendo cada repetição sido representada por 2 plantas/vaso. Para os ensaios de controle da ramulose, utilizou-se a testemunha controle pyraclostrobin e, a partir dos dados de incidência da doença em folhas, foi calculada a porcentagem média de folhas com lesões por repetição para, posteriormente, calcular a área abaixo da curva de progresso da incidência da doença (AACPI) (Shaner & Finney, 1977).

Quanto aos ensaios de controle da mancha-angular, os dados de severidade da doença foram transformados de acordo com o índice de McKinney (1923) para cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) (Shaner & Finney, 1977). Os dados de AACPI e AACPS, referentes ao controle da ramulose e de mancha-angular, respectivamente, foram submetidos à análise de variância separadamente. As médias dos isolados e de ASM foram desdobradas dentro de tratamentos e métodos de aplicação e comparadas pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2000). As médias das testemunhas utilizadas nos ensaios foram comparadas pelo teste de Dunnetts ( $P < 0,001$ ), com os demais tratamentos utilizando o software SAS.

### **Ensaio de campo**

O delineamento experimental para o ensaio de campo foi em blocos ao acaso em esquema fatorial  $4 \times 3 + 3$ , sendo 3 isolados de *Bacillus* spp. e 1 combinação de isolados de *Bacillus* spp. x 3 métodos de aplicação + 1 testemunha água com 4 repetições por tratamento, tendo cada repetição sido representada por uma unidade experimental ou parcela. O tamanho das parcelas foi de 12 m de comprimento por 4,5 m de largura (5 linhas), com 8 sementes/m e espaçamento entre linhas de 0,45 m. Cada parcela útil constituiu-se de 3 linhas centrais de 10 m de comprimento.

A porcentagem de incidência de cada doença avaliada neste ensaio (ramulose e podridão-das-maçãs) foi utilizada para o cálculo da AACPI proposta por Shaner & Finney (1977). Estes dados foram submetidos à análise de variância separadamente. As médias das variáveis foram desdobradas dentro de tratamentos e métodos de aplicação e comparadas, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, utilizando o software SISVAR (Ferreira, 2000). As médias das



testemunhas utilizadas nos ensaios foram comparados pelo teste de Dunnetts ( $P < 0,001$ ), com os demais tratamentos utilizando o software SAS.

#### **4.5 Efeito *in vitro* de bactérias endosporogênicas sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* (*Xam*) e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* (*Cgc*)**

A potencialidade antagonística *in vitro* dos isolados produtores de endósporos testados nos ensaios de casa de vegetação e campo para o controle da mancha-angular e ramulose foi avaliada contra *Xam* e *Cgc*.

Para a avaliação do antagonismo de isolados de *Bacillus* spp. a *Xam* utilizou-se o método de sobrecamada descrito por Romeiro (2007). Para tanto, pipetou-se 1  $\mu$ L da suspensão do isolado de *Bacillus* sp. em dois pontos equidistantes da placa de Petri contendo o meio ágar nutriente. Após período de incubação de 24 horas, a 28°C, as placas foram invertidas e adicionou-se à superfície interna de cada uma delas 1 mL de clorofórmio. Após 30 minutos, as placas foram entreabertas para a eliminação de resíduos de clorofórmio. Posteriormente, adicionaram-se 5 mL de meio semissólido fundente contendo 100  $\mu$ L de suspensão de *Xam* cultivada por 24 horas em meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido sobre o crescimento do *Bacillus* spp. Após o período de incubação de 48 horas a 28°C, as placas foram avaliadas quanto à presença de halo de inibição. Realizaram-se cinco repetições para cada isolado testado.

Quanto ao teste de inibição de *Cgc* pelos isolados de *Bacillus* spp., utilizou-se o método de pareamento de colônias. Para tanto, o isolado de *Cgc* utilizado nas inoculações de plantas nos ensaios de casa de vegetação foi repicado para o centro da placa de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). Em seguida, os isolados de *Bacillus* spp. foram repicados em estrias de 0,5 cm para a mesma placa. Após 7 dias de incubação a 25°C, realizaram-se as avaliações quanto à presença de halo de inibição. Realizaram-se cinco repetições

para cada isolado testado.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Controle da ramulose do algodoeiro em casa de vegetação

Para os métodos de aplicação no controle da ramulose do algodoeiro não houve diferença apenas para os tratamentos ASM e *Bacillus* spp. UFLA401.

No controle da ramulose por diferentes métodos de aplicação dos isolados antagonistas e ASM, todos os tratamentos diferiram significativamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05\%$ ), da testemunha inoculada. O ASM manteve-se como o mais eficaz em todos os métodos de aplicação, não diferindo estatisticamente entre os métodos de aplicação, com média de 68,5% de controle da ramulose em relação à testemunha inoculada com o patógeno. Quanto à eficiência dos métodos de aplicação de *Bacillus* spp. no controle da ramulose do algodoeiro, *B. subtilis* UFLA285 não diferiu significativamente do tratamento ASM em dois métodos de aplicação, o de pulverização (62,1%) e o tratamento de sementes + pulverização (59,2%) (Tabela 1).

*Bacillus* spp. UFLA401 promoveu controle da ramulose significativamente idêntico para todos os métodos de aplicação, com controle médio de 56,6% da doença; no método de aplicação tratamento de sementes + *drenching* não houve diferença significativa do tratamento ASM. Quanto ao isolado *Paenibacillus lentimorbus* MEN2, sua maior eficiência de controle da ramulose foi observada no método de aplicação tratamento de sementes + pulverização da parte aérea de plantas, atingindo 51,6% de controle em relação à testemunha inoculada com o patógeno (Tabela 1). O fungicida pyraclostrobin, utilizado como padrão de controle da ramulose, não diferiu estatisticamente da testemunha absoluta, portanto, apresentou alto grau de proteção das plantas de algodão contra ramulose, sob condições de casa de vegetação.

Quanto ao acúmulo de matéria seca proporcionado pelos tratamentos utilizados nos ensaios de controle da ramulose do algodoeiro, alguns tratamentos

com os isolados bacterianos endosporogênicos não diferiram significativamente da testemunha absoluta, tendo os maiores incrementos de matéria seca de plantas sido proporcionados por *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 (pulverização), com 24,5% de aumento e *Bacillus* spp. UFLA401 (tratamento de sementes + *drenching*), com 23,6% em relação à testemunha inoculada (Tabela 2)

TABELA 1 Isolados de *Bacillus* spp., acibenzolar-S-metil e pyraclostrobin na redução da incidência da ramulose em algodoeiro por diferentes métodos de aplicação, em casa de vegetação.

| TRATAMENTOS          | PULVERIZAÇÃO       |                                   |                           |  | TS + PULVERIZAÇÃO |        |              |  | TS + <i>DRENCHING</i> |       |              |  |
|----------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------|--|-------------------|--------|--------------|--|-----------------------|-------|--------------|--|
|                      | AACPI <sup>8</sup> |                                   | CONTROLE (%) <sup>9</sup> |  | AACPI             |        | CONTROLE (%) |  | AACPI                 |       | CONTROLE (%) |  |
| ASM <sup>1</sup>     | 462,9              | a <sup>10</sup> A <sup>11</sup> * | 66,1                      |  | 395,1             | a A *  | 71,0         |  | 431,9                 | a A * | 68,4         |  |
| UFLA285 <sup>2</sup> | 517,3              | a A *                             | 62,1                      |  | 557,5             | ab A * | 59,2         |  | 782,7                 | b B * | 42,7         |  |
| UFLA401 <sup>3</sup> | 579,7              | ab A *                            | 57,5                      |  | 629,9             | b A *  | 53,9         |  | 567,6                 | a A * | 58,4         |  |
| MEN2 <sup>4</sup>    | 712,6              | b A *                             | 47,8                      |  | 660,8             | b AB * | 51,6         |  | 850,6                 | b B * | 37,7         |  |
| FUNG <sup>5</sup>    | 94,8               | *                                 | -                         |  | -                 |        | -            |  | -                     |       | -            |  |
| TA <sup>6</sup>      | 50,5               | *                                 | -                         |  | -                 |        | -            |  | -                     |       | -            |  |
| INOC <sup>7</sup>    | 1367,0             |                                   | -                         |  | -                 |        | -            |  | -                     |       | -            |  |
| CV (%) 20,13         |                    |                                   |                           |  |                   |        |              |  |                       |       |              |  |

<sup>1</sup>ASM: Acibenzolar-S-metil; <sup>2</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>3</sup>UFLA401: *Bacillus* spp.; <sup>4</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>5</sup>FUNG: pyraclostrobin; <sup>6</sup>TA: Testemunha absoluta; <sup>7</sup>INOC: Testemunha inoculada; <sup>8</sup>Área abaixo da curva de progresso da incidência; <sup>9</sup>Porcentagem de controle da doença em relação à testemunha inoculada. <sup>10</sup>Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>11</sup>Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. \*AACPI significativamente diferente da testemunha inoculada, pelo teste de Dunnett (P<0,01).

TABELA 2 Isolados de *Bacillus* spp., acibenzolar-S-metil e pyraclostrobin no incremento da matéria seca em plantas de algodoeiro na presença de *Colletotrichum gossypii*. var. *cephalosporioides*.

| TRATAMENTOS          | PULVERIZAÇÃO          |                 |                          |      | TS + PULVERIZAÇÃO |      |             |    | TS + <i>DRENCHING</i> |      |             |     |   |   |   |    |      |
|----------------------|-----------------------|-----------------|--------------------------|------|-------------------|------|-------------|----|-----------------------|------|-------------|-----|---|---|---|----|------|
|                      | PESO <sup>8</sup> (g) |                 | AUMENTO (%) <sup>9</sup> |      | PESO (g)          |      | AUMENTO (%) |    | PESO (g)              |      | AUMENTO (%) |     |   |   |   |    |      |
| ASM <sup>1</sup>     | 9,8                   | a <sup>10</sup> | A <sup>11</sup>          | **   | -                 | 8,3  | a           | A  | *                     | **   | -           | 8,2 | a | A | * | ** | -    |
| UFLA285 <sup>2</sup> | 11,6                  | b               | A                        |      | 5,5               | 12,5 | b           | A  |                       | 13,6 | 12,7        | bc  | A |   |   |    | 15,5 |
| UFLA401 <sup>3</sup> | 12,3                  | bc              | A                        |      | 11,8              | 10,8 | b           | AB |                       | -    | 13,6        | c   | B | * |   |    | 23,6 |
| MEN2 <sup>4</sup>    | 13,7                  | c               | A                        | *    | 24,5              | 11,7 | b           | A  |                       | 6,4  | 11,0        | b   | B |   |   |    | 0,0  |
| FUNG <sup>5</sup>    | 16,0                  |                 |                          | * ** | -                 | -    |             |    |                       | -    | -           |     |   |   |   |    | -    |
| TA <sup>6</sup>      | 12,8                  |                 |                          | *    | -                 | -    |             |    |                       | -    | -           |     |   |   |   |    | -    |
| INOC <sup>7</sup>    | 11,0                  |                 |                          |      | -                 | -    |             |    |                       | -    | -           |     |   |   |   |    | -    |

CV (%) 8,3

<sup>1</sup>ASM: Acibenzolar-S-metil; <sup>2</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>3</sup>UFLA401: *Bacillus* spp.; <sup>4</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>5</sup>FUNG: Pyraclostrobin; <sup>6</sup>TA: Testemunha absoluta; <sup>7</sup>INOC: Testemunha inoculada; <sup>8</sup>Peso da matéria seca de plantas; <sup>9</sup>Porcentagem de aumento do peso da matéria seca em relação à testemunha inoculada. <sup>10</sup>Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>11</sup>Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. \*Peso da matéria seca significativamente diferente da testemunha inoculada, pelo teste de Dunnett (P<0,01). \*\*Peso da matéria seca significativamente diferente testemunha absoluta, pelo teste de Dunnett (P<0,01).

## 5.2 Controle da mancha-angular do algodoeiro em casa de vegetação

Em ensaios realizados nos anos de 2008 e 2009 para controle da mancha-angular, o isolado *Bacillus subtilis* UFLA285 foi o mais eficaz no controle da bacteriose, quando aplicado via tratamento de sementes + pulverização da parte aérea, com controle de 58,6% da doença, diferindo estatisticamente, pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), dos demais tratamentos testados para este método de aplicação, exceto do *Bacillus* spp. UFLA401, que também obteve resultados satisfatórios de controle da mancha-angular (52%). Para o método pulverização, ASM proporcionou maior controle, porém, sua eficiência não diferiu estatisticamente dos isolados *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 e *Bacillus subtilis* UFLA285 (Tabela 3).

A eficiência de todos isolados antagonistas no controle da mancha-angular pelo método de aplicação tratamento de sementes + *drenching* foi significativamente inferior aos demais métodos de aplicação. Por este método, apenas com o tratamento ASM obteve-se controle razoável da doença em 45,7%, não diferindo estatisticamente do método de aplicação tratamento de sementes + pulverização. Apesar da menor eficiência dos isolados para controlar a doença via tratamento de sementes + *drenching*, todos diferiram significativamente da testemunha inoculada. Quanto ao tratamento oxiclureto de cobre, o mesmo apresentou baixa eficiência de controle da mancha-angular (34,35%), porém, superior aos tratamentos dos antagonistas via tratamento de sementes + *drenching* (Tabela 3).

O acúmulo de matéria seca de plantas nos ensaios para controle da bacteriose do algodoeiro foi expressivo para alguns isolados testados. Para o método de aplicação apenas por pulverização, todos os isolados testados não diferiram estatisticamente com a testemunha absoluta. Neste método de aplicação, o isolado *Bacillus subtilis* UFLA285 se destacou, pois proporcionou o maior aumento (100%) do peso da matéria seca em relação à testemunha

inoculada. Para *Paenibacillus lentimorbus* MEN2, o método de aplicação não interferiu estatisticamente no peso da matéria seca, além de ser estatisticamente semelhante à testemunha absoluta, para todos os métodos de aplicação. Este isolado também se destacou pelo método de aplicação tratamento de sementes + pulverização, com 72,5% de incremento da matéria seca de plantas em relação à testemunha inoculada (Tabela 4).



TABELA 3 Isolados de *Bacillus* spp., acibenzolar-S-metil e oxiclureto de cobre na redução da severidade da mancha-angular do algodoeiro por diferentes métodos de aplicação.

| TRATAMENTO           | PULVERIZAÇÃO       |                                 |                           |    |      | TS + PULVERIZAÇÃO |       |              |   |    | TS + <i>DRENCHING</i> |       |              |   |   |    |      |      |
|----------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------|----|------|-------------------|-------|--------------|---|----|-----------------------|-------|--------------|---|---|----|------|------|
|                      | AACPS <sup>8</sup> |                                 | CONTROLE (%) <sup>9</sup> |    |      | AACPS             |       | CONTROLE (%) |   |    | AACPS                 |       | CONTROLE (%) |   |   |    |      |      |
| ASM <sup>1</sup>     | 384,5              | a <sup>10</sup> A <sup>11</sup> | *                         | ** | 53,8 | 462,0             | b     | AB           | * | ** | 44,5                  | 452,2 | a            | B | * | ** | 45,7 |      |
| MEN2 <sup>2</sup>    | 421,1              | ab                              | A                         | *  | **   | 49,4              | 472,2 | b            | A | *  | 43,3                  | 608,2 | b            | B | * |    | 27,0 |      |
| UFLA285 <sup>3</sup> | 425,0              | ab                              | A                         | *  | **   | 49,0              | 345,0 | a            | B | *  | **                    | 58,6  | 649,1        | b | C | *  | **   | 22,1 |
| UFLA401 <sup>4</sup> | 469,3              | b                               | A                         | *  |      | 43,6              | 399,3 | ab           | A | *  | **                    | 52,0  | 649,5        | b | B | *  | **   | 22,0 |
| TA <sup>5</sup>      | 17,25              |                                 |                           | *  | **   | -                 | -     |              |   |    | -                     | -     |              |   |   |    | -    |      |
| OXI <sup>6</sup>     | 547,25             |                                 |                           | *  |      | -                 | -     |              |   |    | -                     | -     |              |   |   |    | -    |      |
| INOC <sup>7</sup>    | 833,5              |                                 |                           | ** |      | -                 | -     |              |   |    | -                     | -     |              |   |   |    | -    |      |

CV (%) 8,5

<sup>1</sup>ASM: Acibenzolar-S-metil; <sup>2</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>3</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>4</sup>UFLA401: *Bacillus* spp.; <sup>5</sup>TA: Testemunha absoluta; <sup>6</sup>OXI: oxiclureto de cobre; <sup>7</sup>INOC: testemunha inoculada; <sup>8</sup>Área abaixo da curva de progresso da severidade; <sup>9</sup>Porcentagem de controle da doença em relação à testemunha inoculada. <sup>10</sup>Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>11</sup>Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. \* AACPS significativamente diferente da testemunha inoculada pelo teste de Dunnett (P<0,01). \*\*AACPS significativamente diferente do oxiclureto de cobre, pelo teste de Dunnett (P<0,01).

TABELA 4 Isolados de *Bacillus* spp., acibenzolar-S-metil e pyraclostrobin no incremento da matéria seca em plantas de algodoeiro na presença de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

| TRATAMENTO           | PULVERIZAÇÃO          |                                 |                          |       | TS + PULVERIZAÇÃO |      |             |      | TS + DRENCHING |      |             |      |
|----------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|-------|-------------------|------|-------------|------|----------------|------|-------------|------|
|                      | PESO (g) <sup>8</sup> |                                 | AUMENTO (%) <sup>9</sup> |       | PESO (g)          |      | AUMENTO (%) |      | PESO (g)       |      | AUMENTO (%) |      |
| ASM <sup>1</sup>     | 4,8                   | a <sup>10</sup> A <sup>11</sup> | **                       | 20,0  | 4,5               | a AB | **          | 12,5 | 5,8            | ab B | *           | 45   |
| MEN2 <sup>2</sup>    | 6,2                   | b A                             | *                        | 55,0  | 6,9               | b A  | *           | 72,5 | 6,6            | b A  | *           | 65   |
| UFLA401 <sup>4</sup> | 6,3                   | b A                             | *                        | 57,5  | 5,3               | a A  | **          | 32,5 | 4,7            | a B  | **          | 17,5 |
| UFLA285 <sup>3</sup> | 8,0                   | c A                             | *                        | 100,0 | 6,4               | b B  | *           | 60,0 | 5,4            | a C  |             | 35   |
| TA <sup>5</sup>      | 6,7                   |                                 | *                        | -     | -                 |      |             | -    | -              |      |             | -    |
| OXI <sup>6</sup>     | 6,0                   |                                 | *                        | -     | -                 |      |             | -    | -              |      |             | -    |
| INOC <sup>7</sup>    | 4,0                   |                                 | **                       | -     | -                 |      |             | -    | -              |      |             | -    |
| CV (%) 12,2          |                       |                                 |                          |       |                   |      |             |      |                |      |             |      |

<sup>1</sup>ASM: Acibenzolar-S-metil; <sup>2</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>3</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>4</sup>UFLA401: *Bacillus* spp.; <sup>5</sup>TA: Testemunha absoluta; <sup>6</sup>OXI: oxicloreto de cobre; <sup>7</sup>INOC: testemunha inoculada; <sup>8</sup>Peso da matéria seca; <sup>9</sup>Aumento do peso da matéria seca em relação à testemunha inoculada. <sup>10</sup>Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>11</sup>Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a de 5% de probabilidade. \*Peso da matéria seca significativamente diferente da testemunha inoculada, pelo teste de Dunnett (P<0,01). \*\*Peso da matéria seca significativamente diferente testemunha absoluta, pelo teste de Dunnett (P<0,01).

### **5.3 Controle da ramulose do algodoeiro em campo de produção de algodão**

Para o controle da ramulose do algodoeiro em condições de campo, os tratamentos que proporcionaram os melhores resultados foram os tratamentos de sementes + 2 pulverizações da parte aérea de plantas. Neste método de aplicação destacaram-se *Bacillus* spp. UFLA401, *P. lentimorbus* MEN2 e a combinação de isolados *B. subtilis* UFLA285 + *P. lentimorbus* MEN2 com controle da ramulose variando de 56,6% a 51,2% em relação à testemunha (Tabela 5).

Todos os tratamentos testados para o controle da ramulose diferiram estatisticamente da testemunha água, exceto o isolado *B. subtilis* UFLA285 pelo método de aplicação tratamento de sementes + 1 pulverização. Quanto ao desdobramento dos métodos de aplicação dos isolados antagonistas, todos diferiram significativamente entre si, exceto para o tratamento com *B. subtilis* UFLA285, que manteve o mesmo nível de controle para as três formas de aplicação do isolado (Tabela 5).

A combinação de *B. subtilis* UFLA285 + *P. lentimorbus* MEN2 não apresentou efeito adicional de controle da ramulose.

TABELA 5 Métodos de aplicação de *Bacillus* spp., no controle da ramulose do algodão em campo de produção.

| TRATAMENTO            | TS <sup>5</sup> + 2 PULVERIZAÇÕES |                                 |                            |  | TS + 1 PULVERIZAÇÃO |        |              |  | TS     |        |              |  |
|-----------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------|--|---------------------|--------|--------------|--|--------|--------|--------------|--|
|                       | AACPI <sup>6</sup>                |                                 | CONTROL E (%) <sup>7</sup> |  | AACPI               |        | CONTROLE (%) |  | AACPI  |        | CONTROLE (%) |  |
| UFLA401 <sup>1</sup>  | 1276,2                            | a <sup>8</sup> A <sup>9</sup> * | 56,6                       |  | 1953,7              | a B *  | 33,5         |  | 2311,2 | c C *  | 21,4         |  |
| MEN2 <sup>2</sup>     | 1290,0                            | a A *                           | 56,1                       |  | 1820,0              | a B *  | 38,1         |  | 1748,7 | a B *  | 40,5         |  |
| UFLA 285+MEN2         | 1435,0                            | a A *                           | 51,2                       |  | 1643,7              | a BC * | 44,1         |  | 1852,5 | ab B * | 37,0         |  |
| UFLA 285 <sup>3</sup> | 2152,5                            | b A *                           | 26,8                       |  | 2452,5              | b A    | 16,6         |  | 2219,1 | bc A * | 24,5         |  |
| ÁGUA <sup>4</sup>     | 2940,0                            |                                 |                            |  |                     |        |              |  |        |        |              |  |

CV (%) 11,2

<sup>1</sup>UFLA401: *Bacillus* spp.; <sup>2</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>3</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>4</sup>Água: testemunha; <sup>5</sup>TS: Tratamento de sementes; <sup>6</sup>AACPI: Área abaixo da curva de progresso da incidência; <sup>7</sup>Porcentagem de controle da doença em relação à testemunha inoculada. <sup>8</sup>Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>9</sup>Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. \*AACPI significativamente diferente da testemunha inoculada, pelo teste de Dunnett (P<0,01).

#### **5.4 Controle da podridão-das-maçãs do algodoeiro em campo de produção de algodão**

As bactérias antagonistas utilizadas para o controle das doenças foliares do algodoeiro também foram eficazes para o controle da podridão-das-maçãs, tendo todos os isolados testados diferido estatisticamente da testemunha. Os melhores tratamentos para o método de aplicação tratamento de sementes + 2 pulverizações dos antagonistas foram *P. lentimorbus* MEN2 e a combinação de isolados *B. subtilis* UFLA285 + *P. lentimorbus* MEN2, com 84,0% e 82,8% de controle da podridão-das-maçãs, respectivamente, em relação à testemunha. Para o método de aplicação tratamento de sementes + 1 pulverização da parte aérea, o melhor grupo de controle dos isolados proporcionou redução de até 67,1% de incidência da doença em relação à testemunha (Tabela 6). No desdobramento do fator método de aplicação, apenas o isolado *B. subtilis* UFLA285 manteve-se constante no controle da podridão-das-maçãs, não diferindo estatisticamente entre os métodos de aplicação.

A combinação de *B. subtilis* UFLA285 + *P. lentimorbus* MEN2 não apresentou efeito adicional de controle da podridão-das-maçãs.

TABELA 6 Métodos de aplicação de *Bacillus* spp. no controle da podridão de maçãs do algodoeiro em campo de produção.

| TRATAMENTO            | TS <sup>5</sup> + 2 PULVERIZAÇÕES |                |                           |   | TS + 1 PULVERIZAÇÃO |      |              |   | TS             |      |              |   |   |   |      |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------|---------------------------|---|---------------------|------|--------------|---|----------------|------|--------------|---|---|---|------|
|                       | INCIDÊNCIA (%) <sup>6</sup>       |                | CONTROLE (%) <sup>7</sup> |   | INCIDÊNCIA (%)      |      | CONTROLE (%) |   | INCIDÊNCIA (%) |      | CONTROLE (%) |   |   |   |      |
| MEN2 <sup>1</sup>     | 7,7                               | a <sup>8</sup> | A <sup>9</sup>            | * | 84,0                | 28,6 | b            | B | *              | 41,2 | 35,5         | c | B | * | 27,0 |
| UFLA285+MEN2          | 8,3                               | a              | A                         | * | 82,8                | 19,3 | a            | B | *              | 60,3 | 23,6         | b | B | * | 51,4 |
| UFLA 285 <sup>2</sup> | 17,4                              | b              | A                         | * | 64,2                | 17,4 | a            | A | *              | 64,2 | 12,7         | a | A | * | 73,9 |
| UFLA 401 <sup>3</sup> | 40,1                              | c              | B                         | * | 17,4                | 16,0 | a            | A | *              | 67,1 | 39,9         | c | B | * | 17,9 |
| ÁGUA <sup>4</sup>     | 48,6                              |                |                           |   |                     |      |              |   |                |      |              |   |   |   |      |
| CV (%) 15,3           |                                   |                |                           |   |                     |      |              |   |                |      |              |   |   |   |      |

<sup>1</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>2</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>3</sup>UFLA401: *Bacillus* spp.; <sup>4</sup>Água: testemunha; <sup>5</sup>TS: Tratamento de sementes; <sup>6</sup>Porcentagem de incidência; <sup>7</sup>Porcentagem de controle da doença em relação à testemunha inoculada. <sup>8</sup>Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>9</sup>Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. \*AACPI significativamente diferente da testemunha inoculada, pelo teste de Dunnett (P<0,01).

### **5.5 Produtividade dos tratamentos no ensaio de campo**

Para a produtividade do algodão avaliada em campo, não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha, exceto para a combinação de isolados *B. subtilis* UFLA285 + *P. lentimorbus* MEN2, que apresentou menor produtividade em relação aos demais. No método de aplicação tratamento de sementes + 2 pulverizações, o isolado *P. lentimorbus* MEN2 diferiu significativamente dos demais tratamentos para o mesmo método de aplicação, com produtividade de 207,1 arrobas/ha (Tabela 7).

TABELA 7 Produtividade de algodão após tratamentos com agentes biológicos em ensaio em campo de produção comercial na safra 2008/2009.

| TRATAMENTO            | TS <sup>5</sup> + 2 PULVERIZAÇÕES |                               |   | TS + 1 PULVERIZAÇÃO |        |      | TS    |        |     |       |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|---|---------------------|--------|------|-------|--------|-----|-------|
|                       | Kg/ha <sup>6</sup>                | @/ha                          |   | Kg/ha               | @/ha   |      | Kg/ha | @/ha   |     |       |
| UFLA285+MEN2          | 2044,4                            | a <sup>7</sup> A <sup>8</sup> | * | 136,2               | 2588,1 | a B  | 172,5 | 2988,1 | a B | 199,2 |
| UFLA 285 <sup>2</sup> | 2453,3                            | a A                           |   | 163,5               | 2496,6 | a A  | 166,4 | 3235,5 | a B | 215,7 |
| UFLA 401 <sup>3</sup> | 2557,7                            | ab A                          |   | 170,5               | 2854   | a AB | 190,2 | 3176,6 | a B | 211,7 |
| MEN2 <sup>1</sup>     | 3107,7                            | b A                           |   | 207,1               | 2592,1 | a A  | 172,8 | 3066,6 | a A | 204,4 |
| ÁGUA <sup>4</sup>     | 2781,6                            |                               |   | 185,4               |        |      |       |        |     |       |
| CV (%) 9,1            |                                   |                               |   |                     |        |      |       |        |     |       |

<sup>1</sup>MEN2: *Paenibacillus lentimorbus*; <sup>2</sup>UFLA285: *Bacillus subtilis*; <sup>3</sup>UFLA401: *Bacillus* spp.; <sup>4</sup>Água: testemunha; <sup>5</sup>TS: Tratamento de sementes; <sup>6</sup>kg/ha: Quilograma de algodão em caroço por hectare; <sup>7</sup>Médias seguidas de mesma letra (minúscula) na mesma coluna não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. <sup>8</sup>Médias seguidas de mesma letra (maiúscula) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. \*AACPI significativamente diferente da testemunha inoculada, pelo teste de Dunnett (P<0,01).



### 5.6 Efeito *in vitro* de bactérias endosporogênicas sobre *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*

Todos os isolados bacterianos endosporogênicos testados para o controle da mancha-angular e ramulose apresentaram inibição do crescimento *in vitro* dos patógenos *Xam* e *Cgc* (Figuras 1 e 2).

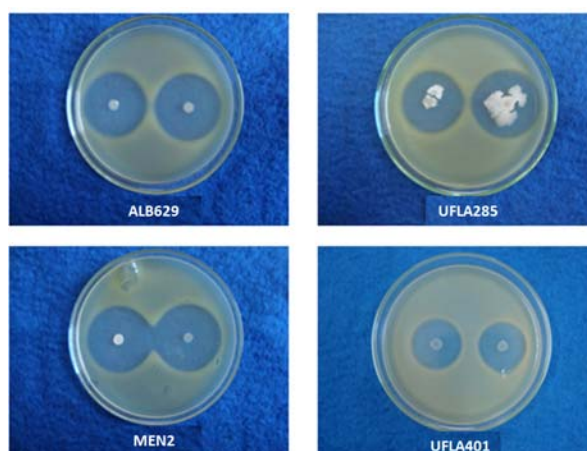


FIGURA 1 Efeito de isolados de *Bacillus subtilis* e *Paenibacillus lentimorbus* na inibição do crescimento *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.

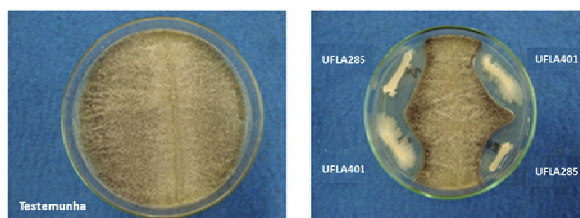


FIGURA 2 Efeito de isolados de *Bacillus* spp. na inibição de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

## 6 DISCUSSÃO

Para todos os métodos de aplicação, os isolados antagonistas diferiram significativamente da testemunha inoculada em todos os ensaios realizados para o controle de ramulose, mancha-angular e podridão-das-maçãs, mantendo consistência dos resultados. *In vitro*, os mesmos isolados promoveram a inibição do crescimento de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

No controle da ramulose do algodoeiro em casa de vegetação, ASM manteve-se como o mais eficaz em todos os métodos de aplicação, não diferindo estatisticamente entre os métodos de aplicação, com média de 68,5% de controle da ramulose em relação à testemunha inoculada com o patógeno. Em ensaio realizado em campo, Chitarra et al. (2007) observaram mesmo nível de controle da ramulose utilizando ASM isolado ou em mistura com o fungicida azoxystrobin. Entretanto, os tratamentos com maiores dosagens de ASM foram os mais produtivos e não interferiram na qualidade da fibra do algodão (Chitarra et al., 2007).

A aplicação de ASM via tratamento de sementes + *drenching* foi eficaz para o controle de doenças foliares do algodoeiro, sendo semelhante aos demais métodos de aplicação testados. Whan et al. (2008) testaram a eficiência de ASM via tratamento de sementes e pulverização das plantas, quatro dias antes da inoculação do patógeno, para o controle da fusariose do algodão. O tratamento de sementes com ASM foi mais eficaz que a aplicação foliar para o controle da fusariose, com aumento da regulação PR proteínas (peroxidase, quitinase e  $\beta$ -1,3-glucanase). Em outros experimentes, ASM aplicado via tratamento de sementes foi mais promissor que em pulverizações foliares (Mondal et al., 2005; Driessen et al., 2006).

Para a mancha-angular, o melhor resultado observado para ASM foi de 53,8% de controle, quando aplicado via pulverização foliar.

O ativador de defesa ASM induz resistência contra um grande espectro de patógenos e pragas em várias espécies de plantas, como ervilha, pepino, trigo, tomate e algodão (Gorlach et al., 1996; Dann & Deverall, 2000; Silva et al., 2003a,b; Mondal et al., 2005).

Não se obteve, neste trabalho, controle satisfatório da mancha-angular aplicando-se o oxiclureto de cobre. A eficiência de fungicidas cúpricos tem sido variável para o controle de bacterioses (Nascimento et al., 2000; Pereira et al., 2000). Segundo Cassetari Neto & Machado (2009), a pulverização de fungicidas cúpricos no controle da mancha-angular do algodoeiro reduz a severidade da doença e as plantas infectadas apresentam recuperação, talvez pelo fato de agirem indiretamente no controle da bacteriose como nutrientes foliares, pois não há dados concretos de que o oxiclureto de cobre seja realmente efetivo no controle da mancha-angular do algodoeiro (Chitarra, 2005; Araújo, 2008a).

Nos ensaios em casa de vegetação visando ao controle da ramulose do algodoeiro, o fungicida piraclostrobin (estrubirulina) controlou a ramulose em 94,8%, não diferindo da testemunha absoluta. A eficiência do piraclostrobin no controle da ramulose é relatada em vários trabalhos. Andrade Junior & Galbieri (2009) avaliaram o número de aplicações de piraclostrobin para o controle da ramulose em cultivar suscetível e verificaram a necessidade de três aplicações do fungicida para manter a ramulose em níveis aceitáveis. Iamamoto & Silveira (2008) observaram, em condições de campo, que os triazóis e as estrobilurinas promoveram excelente controle sobre a mancha de ramulária e ramulose.

Quanto aos métodos de aplicação dos isolados antagonistas para o controle da ramulose e da mancha-angular em casa de vegetação, obtiveram-se diferentes resultados para cada isolado. *Bacillus subtilis* UFLA285 proporcionou semelhante controle da ramulose ao proporcionado pelo ASM, tanto pelo

método de aplicação por pulverização da parte aérea, quanto pelo tratamento de sementes + pulverização. Porém, para o controle da mancha-angular, obteve-se, com este isolado, maior eficiência quando aplicado via tratamento de sementes + pulverização foliar, com 58% de controle da doença. Em trabalhos anteriores, Medeiros (2009) verificou a eficiência desse isolado para o controle de doenças do algodoeiro transmitidas por sementes, como mancha-angular e tombamento, além da proteção contra *Rhizoctonia solani* presente no solo. Portanto, em campo, sugerem-se a aplicação deste isolado via tratamento de sementes e pulverizações periódicas para o controle das doenças mencionadas.

Os isolados endosporogênicos foram testados quanto ao potencial de indução de resistência no controle da mancha-angular e ramulose pelo método de aplicação tratamento de sementes + *drenching*. Esse método de aplicação, apesar de proporcionar controle da mancha-angular em relação à testemunha, proporcionou baixos resultados de controle. Para o controle da ramulose, *Bacillus* spp. UFLA401, pelo mesmo método de aplicação, proporcionou controle satisfatório da doença, sendo semelhante ao do controle obtido pelo tratamento com ASM (68,4%). O ASM aplicado via tratamento de sementes + *drenching* proporcionou controle da mancha-angular duas vezes superior aos isolados antagonistas testados. Ishida et al. (2008b) avaliaram o potencial de rizobactérias na indução de resistência pelo método de aplicação no solo aos 14 dias antes da inoculação do patógeno, tendo os melhores isolados apresentado controle da mancha-angular do algodoeiro acima de 40% em relação à testemunha.

Houve diferença no acúmulo de matéria seca proporcionado pelos tratamentos utilizados nos ensaios de controle da ramulose e mancha-angular do algodoeiro, quando se variou o método de aplicação dos isolados. Os maiores incrementos observados no patossistema algodoeiro/*Cgc* foram proporcionados pelos isolados *P. lentimorbus* MEN2 (24,5%) e *Bacillus* spp. UFLA401

(23,6%), aplicados via pulverização e via tratamento de sementes + *drenching*, respectivamente, em relação à testemunha inoculada.

No patossistema algodoeiro/*Xam*, os isolados *B. subtilis* UFLA285 e *P. lentimorbus* MEN2 se destacaram com 100% e 72% de incremento, pelos métodos de aplicação, respectivamente, pulverização e tratamento de sementes + pulverização, em relação à testemunha inoculada. Portanto, o tratamento com o isolado *P. lentimorbus* MEN2 promoveu o incremento no peso da matéria seca das plantas de algodoeiro, além de promover controle satisfatório da mancha-angular e ramulose em condições de casa de vegetação e de campo (dados não publicados).

O incremento no peso da matéria seca pode estar relacionado à promoção de crescimento pelos antagonistas utilizados no presente estudo, uma vez que o gênero *Bacillus* spp., além de atuar no controle biológico de doenças de plantas, pode promover outros benefícios para as mesmas, como promoção de crescimento e consequente aumento de produtividade das culturas por meio de vários mecanismos, como habilidade para fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, produção de fosfatases, sideróforos e fitormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) (Liu et al., 1995; Ryu et al., 2005; Tsavkelova et al., 2006; Romeiro, 2007).

Dos isolados antagonistas utilizados em ensaio de campo para o controle da ramulose e da podridão-das-maçãs, apenas *B. subtilis* UFLA285 não diferiu quanto ao método de aplicação. O maior controle da podridão-das-maçãs foi obtido com a aplicação dos antagonistas apenas pelo tratamento de sementes.

Medeiros (2009) testou os mesmos isolados antagonistas utilizados nos experimentos deste trabalho, porém, via tratamento de sementes, visando ao controle do tombamento por *Cgc* e da mancha-angular por *Xam*, ambos patógenos transmitidos por sementes. Os isolados *B. subtilis* UFLA285 e *P. lentimorbus* MEN2 promoveram a redução dos sintomas de tombamento em

45% e 56%, respectivamente, em relação à testemunha. Para o controle da mancha-angular, os mesmos isolados reduziram a severidade da doença em 26% e 76% em relação à testemunha inoculada com o patógeno.

Medeiros (2009) verificou também a eficiência de *B. subtilis* UFLA285 na redução do tombamento de plântulas de algodão, causado por *Rhizoctonia solani* AG4, tendo a resposta de controle ocorrido quando as plantas foram inoculadas aos nove dias após o plantio. Estudos dos mecanismos de ação do isolado no controle da doença utilizando a técnica de microarranjo revelaram a alteração na regulação de 246 genes, dentre os quais os relacionados à rota de indução de resistência sistêmica via jasmonato/etileno e à síntese de prolina e aquaporina, as quais estão relacionadas à osmorregulação. A aquaporina foi superexpressa em plantas tratadas com o antagonista e não submetidas a nenhum estresse e subexpressa em plantas infectadas com o patógeno (Medeiros, 2009).

Nos ensaios de campo, observou-se também que o aumento no número de pulverizações dos isolados proporcionou incremento na proteção das plantas contra a ramulose e a podridão-das-maçãs, exceto para *B. subtilis* UFLA285, que manteve o mesmo nível de controle para as duas doenças, em todos os métodos de aplicação e *Bacillus* spp. UFLA401 que não seguiu o padrão de controle dos demais isolados. Além do controle da ramulose e da podridão-das-maçãs o isolado *P. lentimorbus* MEN2, proporcionou também o controle da mancha-angular e ramulose em casa de vegetação e promoveu incremento no peso da matéria seca de plantas de algodão.

## 7 CONCLUSÕES

- 7) Os isolados testados foram eficazes para o controle da mancha-angular, ramulose e podridão-das maçãs-do-algodoeiro, apresentando amplo espectro de ação contra fitopatógenos.
- 8) Os métodos de aplicação dos antagonistas foram eficazes no controle da mancha-angular do algodoeiro, sendo o tratamento de sementes + *drenching* o menos eficaz.
- 9) *Bacillus* spp. UFLA401 e ASM não diferiram quanto ao método de aplicação no controle da ramulose em casa de vegetação.
- 10) O melhor método de aplicação dos antagonistas no campo para o controle da ramulose foi o tratamento de sementes + 2 pulverizações.
- 11) *Bacillus subtilis* UFLA285 não diferiu quanto ao método de aplicação no controle da podridão-das-maçãs em condições de campo.
- 12) Todos isolados inibiram o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* e *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE JUNIOR, E.R.; GALBIERI, R. Influência do número de aplicações de fungicidas no controle de ramulose no algodoeiro em Primavera do Leste – MT. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.S83, ago. 2009. Suplemento.

ARAÚJO, A.E. **Detecção e transmissão planta-semente de *Colletotrichum gossypii* South var. *cephalosporioides* Costa**: efeito de níveis de incidência na semente e do controle químico da parte aérea sobre o progresso da ramulose do algodoeiro. 2008a. 93p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

ARAÚJO, A.E. **Podridão de maçãs do algodoeiro**: principais causas e manejo. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2008b. 22p. (Circular Técnica, 212).

ARYA, S.; PARASHAR, R.D. Biological control of cotton bacterial blight with phylloplane bacterial antagonists. **Tropical Agriculture**, Surrey, v.79, n.1, p.51-55, Jan. 2002.

BALLAMINUT, C. **A podridão de maçãs do algodoeiro**. Disponível em: <[http://www.200.164.229.147:8080/portal\\_algodao](http://www.200.164.229.147:8080/portal_algodao)>. Acesso em: 12 set. 2009.

BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; CASSETARI, L.S.; ALMEIDA, M.F. Efeitos do agente da ramulose sobre plantas de algodoeiro. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.34, p.S238, ago. 2009. Suplemento.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. **Doenças do algodoeiro**: diagnose e controle. Várzea Grande: Universidade de Várzea Grande, 2005. 47p.

CASSETARI NETO, D.; MACHADO, A.Q. Manejo de doenças do algodoeiro. In: NEFIT, D. **Manejo fitossanitário de cultivos agroenergéticos**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia, 2009. cap.13, p.159-174.

CHITARRA, L.G. Qualidade ameaçada. **Revista Cultivar, Grandes Culturas**, Pelotas, ano 7, n.73, p.3-8, 2005.

CHITARRA, L.G.; MEIRA, S.A.; MENEZES, V.L. Controle químico da mancha de ramularia em algodoeiro no município de Campo Verde. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.30, p.S94, ago. 2005. Suplemento.



CHITARRA, L.G.; RODRIGUES, S.M.M.; BETTINI, P.C.; MENEZES, V.L. Controle da ramulose do algodoeiro com uso de acibenzolar-S-methyl isolado e em mistura com fungicida. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.32, p.S195, ago. 2007. Suplemento.

CIA, E. Ocorrência e conhecimento das doenças de algodoeiro anual *Gossypium hirsutum* L. no Brasil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.3, n.3, p.167-177, maio/jul. 1977.

CIA, E.; SALGADO, C.L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium hirsutum*). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v.2, cap.8, p.41-52.

DANN, E.; DEVERALL, B.J. Activation of systemic disease resistance in pea by an avirulent bacterium or a benzothiadiazole, but not by a fungal leaf spot pathogen. **Plant Pathology**, Honolulu, v.49, n.3, p.324-232, June 2000.

DRIESSEN, S.A.; NEHL, D.B.; ALLEN, S.J. Developing bion as a seed treatment for black root rot in cotton. In: AUSTRALIAN COTTON CONFERENCE, 13., 2006, Narrabri. **Proceedings...** Melbourne: Australian Cotton Growers Research Association, 2006. 1 CD-ROM.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: software para análises estatísticas. Lavras: UFLA/DEX, 2000. Software.

FERRO, H.M.; SOUZA, R.M.; MEDEIROS, F.H.V.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, J.C.; SOARES, D.A.; SANTOS NETO, H.; ZANOTTO, E.; DORNELAS, G.A. *Bacillus* spp. para o tratamento de sementes de algodão contaminadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. In: CONGRESSO PAULISTA DE FITOPATOLOGIA, 31., 2008, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2008. 1 CD-ROM.

GORLACH, J.; VOLRATH, S.; KNAUF-BEITER, G.; HENGY, G.; BECKHOVE, U.; KOGEL, K.H. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. **Plant Cell**, Rockville, v.8, n.4, p.629-643, Apr. 1996.

GOULART, A.C.P. Doenças iniciais do algodoeiro: identificação e controle. In: ZAMBOLIM, L. **Sementes: qualidade fitossanitária**. Viçosa, MG: UFV, 2005. cap.15, p.425-449.

IAMAMOTO, M.M. **Doenças foliares do algodoeiro**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

IAMAMOTO, M.M.; SILVEIRA, C. Efeito de fungicidas no complexo de doenças do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.34, p.S98, fev. 2008. Suplemento.

ISHIDA, A.K.N. **Resistência induzida por rizobactérias e acibenzolar-S-metil (ASM) no controle da mancha-angular (*Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) do algodoeiro**. 2004. 145p. Tese (Doutorado em Fitopatologia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; CAVALCANTI, F.R.; OLIVEIRA, D.L.; POZZA, E.A. Rhizobacterium and acibenzolar-S-methyl (ASM) in resistance induction against bacterial blight and expression of defense responses in cotton. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v.33, n.1, p.27-34, Jan./Feb. 2008.

ISHIDA, A.K.N.; SOUZA, R.M.; RESENDE, M.L.V.; ZACARONI, A.B.; VILAS-BOAS, C.H.; SOUZA, J.T. Rizobactérias no controle da mancha-angular do algodoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.1, p.149-156, jan./fev. 2008.

JONES, J.E. The present state of the art and science of cotton breeding for leaf morphological types. In: BELTWISE COTTON RESEARCH CONFERENCE, 1., 1982, Las Vegas. **Proceedings...** Memphis: National Cotton Council, 1982. p.92-99.

JULIATTI, F.C.; DUARTE, R.P.; FREITAS, P.T. Acil benzolar (Bion) em combinação com fungicidas no controle da mancha de ramulária, ferrugem e podridão de maçãs, efeito na produtividade e qualidade das fibras do algodoeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ALGODÃO, 3., 2001, Goiânia. **Anais...** Campina Grande: EMBRAPA Algodão; Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2001. 1 CD-ROM.

JULIATTI, F.C.; POLIZEL, A.C. **Manejo integrado de doenças na cotonicultura brasileira**. Uberlândia: UFU, 2003. 142p.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.60, n.6, p.969-976, June 1970.

LAWRENCE, K.S.; MONKS, D.C.; DELANEY, D.; GLASS, K.; PEGUES, M.D.; COAST, G. **Boll rot and hard lock of cotton project report 2006**. Disponível em: <<http://www.aces.edu>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

LAZO, G.R.; GABRIEL, D.W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.77, n.3, p.448-453, Mar. 1987.

LIU, L.; KLOPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber against Fusarium wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, Saint Paul, v.85, n.6, p.695-698, June 1995.

MALAVOLTA JUNIOR, V.A.; DESTEFANO, S.A.L.; BERIAM, L.O.S.; PIZZINATTO, M.A.; CIA, E. Crestamento foliar, nova sintomatologia em algodoeiro causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.34, n.2, p.168-171, abr./jun. 2008.

MCKINNEY, R.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v.26, n.1, p.195-218, Jan. 1923.

MEDEIROS, F.H.V. **Rhizobacteria for cotton seed treatment**: screening, field efficacy and molecular modes of action. 2009. 101p. Thesis (Doctor in Phytopathology)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MEDEIROS, F.H.V.; SOUZA, R.M.; FERRO, H.M.; MEDEIROS, F.C.L.; POMELLA, A.W.V.; MACHADO, J.C.; SANTOS NETO, H.; SOARES, D.A.; ZANOTTO, E.; PARE, P.W. *Bacillus* spp. to manage seed-born *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* damping-off. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, n.8, p.S102, Aug. 2008.

MIRANDA, J.E.; SUASSUNA, N.D. **Guia de identificação e controle das principais pragas e doenças do algodoeiro**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2004. 47p. (Circular Técnica, 76).

MONDAL, A.H.; NEHL, D.B.; ALLEN, S.J. Acibenzolar -S: methyl induces systemic resistance in cotton against black root rot caused by *Thielaviopsis basicola*. **Australian Plant Pathology**, Melbourne, v.34, n.4, p.499-507, Dec. 2005.

NASCIMENTO, A.R.P.; SILVA, Z.E.; SILVA, V.A.V.; AGUIAR, I.F.; SOUZA, G.S.C.; PAZ, C.D. Sensibilidade “in vitro” de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* a bactericidas e fungicidas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.S326-S327, 2000. Suplemento.

PENNA, J.C.V. Cultivares diferentes, lucro maior. **Cultivar**, Pelotas, v.2, n.17, p.32-36, jun. 2000.

PEREIRA, J.L.A.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, M.R. Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* ao cobre. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.25, p.S328, ago. 2000. Suplemento.

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

RYU, C.M.; HU, C.H.; LOCY, R.D.; KLOEPPER, J.W. Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Soil**, Rockville, v.268, n.1, p.285-292, Jan. 2005.

SHANER, G.; FINNEY, R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox Wheat. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v.67, n.8, p.1051-1056, Aug. 1977.

SIDHU, G.S.; WEBSTER, J.M. The use of aminoacid fungal auxotrophs to study the predisposition phenomena in the root-knot: wilt fungus disease complex. **Physiological Plant Pathology**, London, v.11, n.2, p.117-127, Sept. 1977.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V.; SOUZA, R.M.; CAMPOS, J.R. Avaliação comparativa do indutor de resistência acibenzolar-S-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* no tomateiro. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.29, n.3, p.244-248, jul./set. 2003a.

SILVA, L.H.C.P.; RESENDE, M.L.V.; SOUZA, R.M.; CAMPOS, J.R.; CASTRO, A.M.S. Indução de resistência contra *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro por acibenzolar-S-metil. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.29, n.2, p.177-181, abr./jun. 2003b.

SOOMRO, A.R.; SOOMRO, A.W.; MALLAH, G.H.; MEMON, A.M.; SOOMRO, A.H.; KALHORO, A.D. Okra leaf cotton and its utilization in Sindh. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Faisalabad, v.3, n.1, p.188-190, Jan. 2000.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Clifton, v.42, n.2, p.117-126, June 2006.

WHAN, J.A.; DANN, E.K.; SMITH, L.J.; AITKEN, E.A.B. Acibenzolar-S-methyl-induced alteration of defence gene expression and enzyme activity in cotton infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.73, n.6, p.175-182, Dec. 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento de novas táticas de controle de doenças do algodoeiro é necessário para reduzir os riscos de contaminação do ambiente e as agressões à saúde dos trabalhadores, bem como o surgimento de patógenos resistentes a fungicidas e a redução dos custos de produção. Neste contexto, o biocontrole de doenças do algodoeiro utilizando bactérias benéficas surge como alternativa eficaz a ser incorporada ao manejo integrado de doenças.

Neste estudo, os resultados obtidos sugerem amplo espectro de ação de isolados endosporogênicos no controle biológico das doenças foliares do algodoeiro, além de proporcionar aumento da qualidade de fibra. Estudos anteriores com esses isolados foram realizados para avaliar sua eficiência no controle de doenças causadas por patógenos transmitidos por sementes de algodão e proteção contra patógeno de solo. Portanto, têm grande potencial na aplicação via tratamento de sementes, bem como em aplicações foliares para proteção de plantas contra doenças.

Apesar do sucesso no controle das doenças, existe o desafio de viabilizar seu uso pelos produtores de algodão. Para tanto, é necessário o desenvolvimento de formulações que possam garantir seu potencial de controle e tempo de prateleira por período prolongado.