



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**BIOFERTILIZANTE COMO FERRAMENTA PARA INCREMENTAR A  
DIVERSIDADE MICROBIANA VISANDO O MANEJO DE DOENÇAS DE  
PLANTAS**

**MARIA AUGUSTA DE CAMARGO FERRAZ MACHADO**

**Araras  
(2010)**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL**

**BIOFERTILIZANTE COMO FERRAMENTA PARA INCREMENTAR A  
DIVERSIDADE MICROBIANA VISANDO O MANEJO DE DOENÇAS DE  
PLANTAS**

**MARIA AUGUSTA DE CAMARGO FERRAZ MACHADO**

**ORIENTADOR: PROF. Dr. WAGNER BETTIOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e Desenvolvimento Rural como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL

**Araras  
(2010)**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M149bc

Machado, Maria Augusta de Camargo Ferraz.  
Biofertilizante como ferramenta para incrementar a  
diversidade microbiana visando o manejo de doenças de  
plantas / Maria Augusta de Camargo Ferraz Machado. --  
São Carlos : UFSCar, 2010.  
68 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São  
Carlos, 2010.

1. Controle biológico. 2. Biofertilizantes. 3. Matéria  
orgânica. 4. Levedura. I. Título.

CDD: 632.96 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
DE  
**MARIA AUGUSTA DE CAMARGO FERRAZ MACHADO**  
APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
AGROECOLOGIA E DESENVOLVIMENTO RURAL, DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 04 DE MARÇO DE 2010.

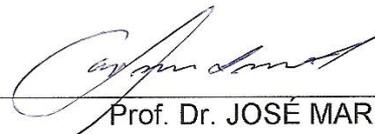
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. WAGNER BETTIOL

ORIENTADOR

EMBRAPA MEIO AMBIENTE



Prof. Dr. JOSÉ MARIA GUSMAN FERRAZ

PPGADR



Prof. Dr. MARCELO AUGUSTO BOECHAT MORANDI

EMBRAPA MEIO AMBIENTE

*Aos meus pais Eloy e Lília,*

*Aos meus irmãos Eloy Neto, Carlos Gustavo e João Guilherme,*

*Ao meu avó João (in memoriam)*

*DEDICO*

*Ao Felipe,*

*OFEREÇO*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar força para a realização desse trabalho;

Aos meus pais Eloy e Lilia, pelo apoio, carinho, compreensão e por nunca medirem esforços em minha educação;

Aos meus irmãos Eloy Neto, Carlos Gustavo e João Guilherme, pelos conselhos e pelo apoio em minhas decisões. Às minhas cunhadas Denise e Ana Marta, e aos meus sobrinhos Gustavo, Carina e Luisa, pelo carinho e alegrias, sempre;

Ao Felipe, pelo apoio em minhas decisões e ajuda sempre que precisei, pelo carinho, companheirismo e principalmente pela paciência;

Ao Dr. Wagner Bettiol, pela orientação, confiança, amizade e aprendizado;

Ao Dr. Marcelo Morandi, pelo apoio, amizade e ajuda com as análises estatísticas;

A todos os funcionários da Embrapa Meio Ambiente e da Universidade Federal de São Carlos – Campus Araras;

Aos técnicos João Luis, Márcia e Rosely do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, pelo apoio sempre que precisei;

Aos estagiários do Laboratório de Microbiologia Ambiental, pelo carinho e apoio;

À Livia Mendes, pela amizade, carinho, conselhos, desabafos e happy hours;

À Suikinai, Mirian e Rute, pelo apoio, carinho, amizade e bons momentos vividos na república LMA;

Ao Alexandre Sereda e ao Alexandre Visconti, pelo carinho, apoio, amizade e churrascos;

Aos profissionais do Campo Experimental da Embrapa Meio Ambiente, Abrahão, Waldemore, Henrique, Antônio, Laércio, Brazilino, Valdecir, Vicente e Célia, pelo apoio na condução dos experimentos;

Aos motoristas da Embrapa Meio Ambiente, Sérgio, Catarino e Walter, pelo carinho e pelas viagens à Holambra;

Aos bibliotecários Victor e Maria Amélia, da Embrapa Meio Ambiente, pelo carinho, dedicação, eficiência e apoio;

Aos coordenadores e professores do curso de Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, pela acolhida e inestimável contribuição fornecida na minha formação;

Aos colegas da 2ª turma de Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural, pelo agradável convívio, aprendizado e discussões enriquecedoras;

À Johannes P. W. de Wit e Ronaldo A. Kievitsboschi pela concessão da bolsa de estudo via Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (FUNDAG) e fornecimento do material para realização dos experimentos;

Ao Dr. Carlos Rosa, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela identificação do isolado de levedura;

Aos meus amigos de São Carlos, pelo carinho e apoio.

## SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 Controle alternativo de doenças, pragas e plantas espontâneas .....	3
2.1.1 Uso da matéria orgânica no controle de fitopatógenos do solo.....	4
2.1.2 Uso do biofertilizante no controle de doenças de plantas .....	6
2.2 Controle biológico de doenças de plantas.....	12
2.2.1. Leveduras do filoplano no controle biológico de doenças de plantas ....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	17
3.1 Isolamento de leveduras do filoplano de lírios produzidos no sistema convencional e sem uso de agrotóxicos .....	17
3.2 <i>Sporidiobolus pararoseus</i> no controle biológico de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de lírio e morango.....	18
3.3 Inibição do crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> in vitro por <i>Sporidiobolus pararoseus</i> .....	19
3.4 Comunidade microbiana epifítica da planta de lírio convencional e sem uso de agrotóxicos e dos biofertilizantes .....	19
3.5 Atividade enzimática em extratos foliares de plantas de lírio desenvolvidas no sistema convencional e sem uso de agrotóxico .....	21
3.6 Efeito de materiais orgânicos e biofertilizantes no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos .....	22
3.7 Efeito do biofertilizante no controle de doenças de plantas .....	23
3.7.1 Tombamento causado por <i>Pythium</i> spp. em pepino .....	23
3.7.2 Tombamento causado por <i>Sclerotium</i> spp. em pepino .....	24
3.7.3 Controle do oídio ( <i>Sphaerotheca fuliginea</i> ) da abobrinha .....	24
3.7.4 Controle de <i>Cylindrocladium</i> spp. em <i>Spathiphyllum</i> sp. ....	25
3.8 Efeito de biofertilizante na promoção de crescimento do feijoeiro .....	25
3.9 Análises Estatísticas .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 Isolamento de leveduras do filoplano de lírios produzidos no sistema convencional e sem uso de agrotóxicos .....	27

4.2 Efeito de <i>Sporidiobolus pararoseus</i> no controle biológico de <i>Botrytis cinerea</i> em discos de folhas de lírio e morango.....	30
4.3 Inibição do crescimento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> in vitro por <i>Sporidiobolus pararoseus</i> .....	38
4.4 Comunidade microbiana epifítica da planta de lírio convencional e sem agrotóxicos e dos biofertilizantes .....	38
4.5 Atividade enzimática em extratos foliares de plantas de lírio convencional e sem uso de agrotóxicos .....	40
4.6 Efeito de materiais orgânicos e biofertilizantes no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos .....	43
4.7 Efeito do biofertilizante no controle de doenças de plantas .....	53
4.8 Promoção de crescimento com biofertilizante na cultura do feijoeiro.....	54
5. CONCLUSÕES .....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Número de colônias de leveduras em discos de folhas de lírio de plantas produzidas sem uso de agrotóxicos e convencional em relação à altura da planta, no momento da coleta (a) e uma semana após a primeira avaliação (b). As barras na vertical indicam o desvio padrão. .... 29
- Figura 2.** Número de colônias de leveduras em discos de folha de lírio de plantas produzidas sem uso de agrotóxicos e convencional em relação à face (adaxial e abaxial) das folhas, no momento da coleta (a) e após uma semana da primeira avaliação (b). As barras na vertical indicam o desvio padrão. .... 30
- Figura 3.** Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação 24 h antes, simultânea e 24 h depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). .... 31
- Figura 4.** Severidade de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio no sistema integrado. BC = *B. cinerea*; lev 5, 6 e 7 = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; a, s, d = aplicação 24 h antes, simultaneamente e 24 h depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. .... 32
- Figura 5.** Efeito de *Sporidiobolus pararoseus* sobre a área abaixo da curva de esporulação (AACE) de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio quando dispensadas antes, simultânea e após o patógeno. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação 24 h antes, simultânea e 24 h depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). .... 33
- Figura 6.** Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morango. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação antes, simultânea e depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). .... 35

- Figura 7.** Severidade de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morango. BC = *B. cinerea*; lev 5, 6 e 7 = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; a, s, d = aplicação antes, simultaneamente e depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. ..... 36
- Figura 8.** Efeito de *Sporidiobolus pararoseus* sobre a área abaixo da curva de esporulação (AAEC) de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morango quando dispensadas antes, simultânea e após o patógeno. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação antes, simultânea e depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). ..... 37
- Figura 9.** Comunidade de bactérias totais; *Bacillus*; leveduras e fungos de folhas de lírio convencional e sem uso de agrotóxicos em Unidade formadora de colônias (ufc/g). Médias seguidas de mesma letra não diferenciam entre si (Teste t 5%). ..... 39
- Figura 10.** Comunidade de Bactérias totais e *Bacillus* em Unidade formadora de colônias (ufc) dos Biofertilizantes A e J. Médias seguidas de mesma letra não diferenciam entre si (Teste t 5%). ..... 40
- Figura 11.** Atividade das enzimas  $\beta$ -1,3 glucanase (a); quitinase (b); fenilalanil amônio-liase (c); lipoxigenase (d) e (e) peroxidase determinadas em extrato foliar de plantas de lírio desenvolvidas nos sistemas convencional e sem uso de agrotóxicos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Teste t 5%). ..... 42
- Figura 12.** Efeito de extratos aquosos de matérias orgânicas utilizadas na produção de biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *Phytophthora*; *Pythium*; *Fusarium* e *Sclerotium* [húmus de minhoca (a), cama de frango (b), esterco de suíno (c) e de um produto à base de farelo de osso e levedo de cerveja (FOLC) (d)]. ..... 45
- Figura 13.** Inibição do crescimento micelial de *Phytophthora* e *Pythium* por extrato aquoso de cama de frango (CF) e esterco de suíno (ES), respectivamente, com suas respectivas linhas de tendência. .... 46

- Figura 14.** Inibição do crescimento micelial de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* e *Sclerotium* pelos biofertilizantes J e A..... 51
- Figura 15.** Efeito de cama de frango (CF), esterco de suíno (ES), farelo de osso e levedo de cerveja (FOLC) e húmus de minhoca (HM) (a) e aos biofertilizantes Biof A e Biof J (b) no crescimento micelial de *Fusarium*, *Sclerotium*, *Pythium* e *Phytophthora*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). ..... 52
- Figura 16.** Efeito de biofertilizantes sobre a área abaixo da curva de progresso das doenças causadas por *Sphaerotheca fuliginea* (a), *Sclerotium* (b), *Cylindrocladium* (c) e *Pythium* (d) e suas respectivas linhas de tendência..... 54
- Figura 17.** Efeito dos biofertilizantes A e J, pulverizados nas folhas, sobre a área abaixo da curva de altura, tamanho de internódio (TI) e peso fresco da parte aérea (PFA) do feijoeiro. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%). ..... 56

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Atributos químicos dos materiais orgânicos utilizados nos estudos. ES = Esterco de suíno; CF = Cama de frango; FOLC = Farelo de osso e levedo de cerveja e HM = Húmus de minhoca. ....	49
<b>Tabela 2.</b> Atributos químicos dos biofertilizantes J e A utilizados nos estudos.	50
<b>Tabela 3.</b> Área abaixo da curva para altura, tamanho de internódio (TI), área foliar (AF), peso fresco da parte aérea (PFA) e peso fresco da raiz (PFR), para cada biofertilizante na presença e ausência de adubação com NPK. A e J = biofertilizantes A e J, respectivamente; (+) e (-) = presença e ausência, respectivamente; NPK = adubação com NPK de acordo com a recomendação para a cultura. ....	55

# **BIOFERTILIZANTE COMO FERRAMENTA PARA INCREMENTAR A DIVERSIDADE MICROBIANA VISANDO O MANEJO DE DOENÇAS DE PLANTAS**

**Autor: MARIA AUGUSTA DE CAMARGO FERRAZ MACHADO**

**Orientador: Dr. WAGNER BETTIOL**

## **RESUMO**

O trabalho teve como objetivos isolar leveduras do filoplano de lírio de um sistema convencional, com alto uso de agrotóxicos, com um sem uso de agrotóxicos, com uso de biofertilizante e agentes de biocontrole, avaliar o antagonismo da levedura *Sporidiobolus pararoseus*, isolada de folhas de lírio produzidas sem agrotóxicos, sobre *Botrytis cinerea*, determinar a comunidade microbiana epifítica da planta de lírio convencional e sem uso de agrotóxico, quantificar enzimas relacionadas com indução de resistência em plantas de lírios produzidas nesses dois sistemas, caracterizar microbiologicamente dois biofertilizantes produzidos aerobicamente, um a partir de composto orgânico, húmus de minhoca, levedo de cerveja e melão, e outro a partir de esterco de suíno, cama de frango, farelo de osso e açúcar; avaliar o efeito dos biofertilizantes na promoção de crescimento das plantas e no controle de fitopatógenos do solo e de parte aérea.

Nos estudos foram observados que: a população de bactérias, *Bacillus*, leveduras e fungos em plantas de lírio conduzidas no sistema convencional é reduzida e que a população desses organismos é elevada nas plantas conduzidas no sistema sem uso de agrotóxicos; *Sporidiobolus pararoseus*, principal componente da comunidade microbiana da superfície das folhas de lírio tratadas com biofertilizante, apresenta potencial na redução da incidência e severidade de *Botrytis cinerea* sendo fundamental manter elevada a sua população para atuar no controle biológico natural da doença; os biofertilizantes, assim como os materiais orgânicos utilizados na produção, possuem potencial no controle de fitopatógenos do solo; esterco de suíno foi mais eficiente na redução do crescimento micelial de *Pythium*; os

biofertilizantes apenas promoveram o crescimento da planta na presença de NPK; os biofertilizantes não controlaram o oídio da abobrinha, indicando que o efeito dos biofertilizantes sobre as doenças de plantas depende do material orgânico e do patossistema.

## **BIOFERTILIZER AS TOOL TO INCREASE MICROBIAL DIVERSITY FOR MANAGEMENT OF PLANTS DISEASES**

**Author: MARIA AUGUSTA MACHADO FERRAZ DE CAMARGO**

**Adviser: Dr. Wagner Bettiol**

### **ABSTRACT**

In this study were compared the community of yeasts in the phylloplane of lily a conventional system with high pesticide use, with an without pesticide use, with the use of biofertilizers and biocontrol agents; to evaluate the antagonism of yeast *Sporidiobolus pararoseus* isolated from leaves of lily on *Botrytis cinerea*; determined the microbial epiphytic in plant lily conventional and without pesticide use systems; characterized microbiological two biofertilizers produced aerobically, one from compost, earthworm-compost, yeast and molasses, and another from swine manure, poultry litter, bone meal and sugar; evaluated the effect of biofertilizers on plant growth-promoting and on the control of pathogens. We observed: the population of bacteria, *Bacillus*, yeasts and fungi in plants of lily conducted in the conventional system with high pesticide use is low and the population of these organisms is higher in plants cultivated in system without use of pesticides; *S. pararoseus* is the main component of the microbial community of the lily phyloplane in leaves treated with biofertilizer; *S. pararoseus* has potential in reducing the incidence and severity of *B. cinerea* and is essential to maintain a high population to act in the natural of biological control of the disease; biofertilizers as well as organic materials used in production have the potential to control pathogens; swine manure showed higher efficacy in reducing the mycelial growth of *Pythium*; biofertilizers promoted growth in the plants with the presence of NPK; biofertilizers did not control powdery mildew on zucchini squash, indicating that the effect of biofertilizers on plant diseases depends on the organic material and pathosystem.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso intensivo de agrotóxicos na agricultura tem promovido diversos problemas de ordem ambiental, desequilíbrios biológicos e redução da biodiversidade. A sociedade tem se preocupado com a qualidade de vida, exigindo produtos livres de agrotóxicos e comercializados de forma transparente, obedecendo aos princípios do comércio solidário.

Os métodos convencionais de controle, por meio do uso de agrotóxicos, geram resultados imediatos, tornando-se, em curto prazo, atraentes aos agricultores.

Alternativas vêm sendo criadas a fim de reduzir a dependência do agricultor dessas tecnologias, como o uso da matéria orgânica tanto por meio da incorporação ao solo como após transformação. Nesse sentido, uma das alternativas disponíveis é o uso do biofertilizante produzidos por meio de fermentações aeróbias de composto orgânico. As vantagens da sua utilização estão principalmente no custo e na disponibilidade do produto. Assim, o agricultor não depende da compra de insumos, pois pode ser produzido a partir de diversas fontes de matéria orgânica, possibilitando o aproveitamento do material disponível na propriedade, diminuindo o aporte de energia externa.

Os biofertilizantes contêm células vivas ou latentes de microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras) e colaboram com a introdução de organismos benéficos para as plantas e para o agroecossistema, além de possuir nutrientes necessários para a nutrição vegetal. Quanto mais diversificada a matéria prima para a produção do biofertilizante, maior as

possibilidades de interações entre microrganismos antagonistas, aumentando a chance de sucesso no controle de doenças.

O presente trabalho teve como objetivos o isolamento de leveduras do filoplano de lírios convencional e sem uso de agrotóxicos; avaliar o antagonismo da levedura *Sporidiobolus pararoseus*, isolada do filoplano de lírios produzidos sem uso de agrotóxicos, sobre *Botrytis cinerea*; determinar a comunidade microbiana epifítica das plantas de lírios produzidas nesses dois sistemas; quantificar enzimas relacionadas com indução de resistência das plantas de lírio convencional e sem uso de agrotóxicos; avaliar o efeito dos biofertilizantes e dos materiais orgânicos no crescimento micelial de fitopatógenos; avaliar o efeito dos biofertilizantes na promoção de crescimento de plantas e no controle

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Controle alternativo de doenças, pragas e plantas espontâneas**

O uso intensivo de agrotóxicos para controle de doenças, pragas e plantas espontâneas na agricultura tem reconhecidamente promovido diversos problemas de ordem ambiental, como contaminação de alimentos, do solo, da água, dos animais e do próprio homem; resistência a agrotóxicos; desequilíbrios biológicos; e redução da biodiversidade, entre outros (MORANDI et al., 2009). A busca por métodos alternativos de controle se intensificaram no início da década de 60 em decorrência dos danos causados pelo uso indiscriminado desses produtos na agricultura. A partir daí, órgãos governamentais em todo o mundo aumentaram as restrições para o registro e uso de produtos químicos e passaram a estimular o desenvolvimento de tecnologias alternativas e produtos menos deletérios ao ambiente e ao homem. Nesse contexto, podem ser considerados alternativos quaisquer métodos de controle que não façam uso de produtos químicos sintéticos (PATRÍCIO, 2007). De acordo com Costa e Campanhola (1997), no que diz respeito ao enfoque sistêmico e ao entendimento holístico da agricultura o qual contempla as condicionantes biológicas, ecológicas e socioeconômicas, o setor orgânico trabalha com um referencial analítico mais abrangente que os segmentos convencionais. Para esses autores, sob distintas orientações, essas iniciativas estão fundamentadas em princípios técnico-agronômicos, com ênfase nos

aspectos biológicos, ecológicos e/ou orgânicos. Todas têm alcançado resultados produtivos expressivos, possivelmente por considerar toda a complexidade da atividade agrícola, seus aspectos ambientais, sociais e econômicos financeiros.

Esse enfoque altera as prioridades do sistema convencional de agricultura em relação ao uso de fontes não renováveis, principalmente de energia, e altera a visão sobre os níveis adequados do balanço entre a produção de alimentos e os impactos no ambiente. As alterações implicam na redução da dependência de produtos químicos e outros insumos energéticos, além do maior uso de processos biológicos nos sistemas agrícolas (BETTIOL & GHINI, 2003).

Diversas técnicas utilizadas para minimizar os danos ocasionados por esses problemas fitossanitários contaminam o ambiente ou causam alterações que comprometem a sustentabilidade do agroecossistema (BETTIOL & GHINI, 2003). Em contraste com a agricultura convencional, os sistemas alternativos buscam obter vantagens das interações de ocorrência natural.

A fim de minimizar os danos causados pelo uso abusivo de agrotóxicos, vêm sendo criadas alternativas ao controle de pragas, doenças e plantas espontâneas, como o uso da matéria orgânica, tanto por meio da incorporação ao solo como após transformação (BETTIOL & GHINI, 2003).

### **2.1.1 Uso da matéria orgânica no controle de fitopatógenos do solo**

Na agricultura o uso da matéria orgânica é uma tradição entre os agricultores, sendo predominante na floricultura, na produção de plantas em vasos e em viveiros e no cultivo de hortaliças (LOUVET, 1986).

O uso da matéria orgânica no controle de fitopatógenos de solo tem como princípio o conceito de equilíbrio biológico, criando um ambiente inóspito ao patógeno com o objetivo de reduzir o potencial de inóculo a ponto de não causar o dano. Assim, existem solos que suprimem o patógeno, enquanto outros suprimem a doença (BETTIOL & GHINI, 2005). Dentre os organismos envolvidos na supressividade de solos, os fungos são os mais estudados (BETTIOL et al., 2009). De acordo com esses autores, isso se deve ao

interesse na obtenção de produtos comerciais à base de fungos para controle biológico de patógenos habitantes do solo.

A atividade de microrganismos antagonistas envolvidos em mecanismos de controle biológico é afetada pelas características físico-químicas do composto, principalmente teor de nutrientes e relação carbono/nitrogênio (PEREIRA et al, 1996). O restabelecimento do balanço da microbiota do solo por meio da adição de matéria orgânica mostra-se um método viável, de baixo custo e ambientalmente adequado (VISCONTI, 2008). Porém, cada material orgânico apresenta características peculiares que podem ou não tornar o composto supressivo a determinados patógenos (TERMORSHUIZEN et al., 1996).

Os compostos geralmente utilizados são de origem agrícola e urbano-industrial, como restos de culturas; borra e palha de café; farinhas de sangue, de osso e de peixe; esterco suíno e bovino; cama aviária; hidrolisado e emulsão de peixe, casca de camarão; lodo de esgoto e composto de lixo (PINTO, 2008). Podem apresentar consistência líquida ou sólida e ser aplicados diretamente no solo ou, passar por um processo de decomposição biológica antes de sua aplicação. Esse processo quando aeróbico é denominado compostagem, cujo produto é chamado de composto. A compostagem é um processo biológico de transformação da matéria orgânica bruta em materiais orgânicos estáveis e prontamente utilizáveis. Ela oferece vantagens sobre outras práticas como um processo de tratamento de resíduos respeitador do ambiente.

A composição da matéria prima utilizada na preparação do composto afeta o potencial para o controle biológico bem como a microbiota ativa no controle (HOITINK et al., 1996). De acordo com Hoitink e Fahy (1986) e Hoitink et al. (1996), o processo pode ser melhorado com a recolonização natural ou controlada de antagonistas ao composto antes do seu uso na agricultura.

O material orgânico compostado fornece aos solos nutrientes, hormônios, aminoácidos e outras substâncias provenientes de sua decomposição, além de melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. A utilização de compostos orgânicos na agricultura como fonte de nutrientes para as plantas e para a comunidade microbiana do solo, contribui para a reciclagem de resíduos

e redução do uso de fertilizantes sintéticos não-renováveis (THERMORSHUIZEN et al., 2006).

Esses compostos podem induzir a produção de ácidos orgânicos e amônia além de fornecerem substratos capazes de estimular a comunidade microbiana de antagonistas limitando a atividade dos fitopatógenos por meio da competição por espaço e nutrientes, antibiose e resistência induzida (HOITINK & BOEHM, 1999) e favorecendo a produção de metabólitos tóxicos aos fitopatógenos (PINTO, 2008). Lumsden et al (1983) verificaram que a liberação de substâncias fungitóxicas da matéria orgânica presente no composto de lodo de esgoto reduziu significativamente *Aphanomyces* em ervilha, *Rhizoctonia* em feijoeiro, algodão e rabanete, *Sclerotinia* em alface, *Fusarium* em pepino e *Phytophthora* em pimenta. Dissanayake e Hoy (1999) verificaram que a podridão de raízes em cana-de-açúcar foi reduzida por meio da aplicação de composto ao solo. De acordo com esses autores, os resultados sugerem que a comunidade microbiana associada a esse composto foi capaz de proporcionar a supressão da doença aumentando também o crescimento da planta.

### **2.1.2 Uso do biofertilizante no controle de doenças de plantas**

De acordo com o DECRETO do MAPA Nº 4.954 DE 14 DE JANEIRO DE 2004 (MAPA, 2004), biofertilizante “é um produto que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante”. Segundo Vessey (2003), do ponto de vista microbiológico, o biofertilizante é “uma mistura que contém microrganismos vivos, os quais, quando dispensados na planta por diferentes métodos, colonizam a rizosfera e, ou, o interior da planta e promovem crescimento, por aumentar a disponibilidade de nutrientes primários.”

Uma das formas de produção é a obtida pela digestão aeróbia ou anaeróbia do material orgânico em meio líquido em um equipamento denominado biodigestor (BETTIOL et al., 1998). O produto final dessa fermentação pode ser usado tanto como fertilizante quanto no controle de fitopatógenos.

As vantagens da sua utilização estão principalmente no custo e na disponibilidade do produto. O custo é basicamente o relacionado à mão de obra para preparo do material pelo próprio agricultor (BETTIOL, 2003). Assim, o agricultor não depende da compra de insumos, pois pode ser produzido a partir de diversas fontes de matéria orgânica, possibilitando o aproveitamento do material disponível na propriedade, diminuindo o aporte de energia externa. A aplicação do biofertilizante poupa energia, aumenta a eficiência dos micronutrientes aplicados evitando o perigo de intoxicação e barateando o custo e, principalmente, acelera a recuperação do solo (PINHEIRO & BARRETO, 2005).

Os biofertilizantes contêm células vivas ou latentes de microrganismos (bactérias, leveduras, algas, protozoários e fungos filamentosos), metabólitos e quelatos organominerais (MEDEIROS et al., 2002). Podem ser introduzidos nos agroecossistemas por meio de pulverizações foliares, fertirrigação ou aplicados diretamente ao solo.

Quando o biofertilizante é produzido utilizando-se esterco de bovino, acredita-se que a maioria dos microrganismos presentes seja proveniente do trato digestivo dos animais (MEDEIROS, 2002). De acordo com Pinheiro & Barreto (2005), quando o esterco ou biomassa é colocado para fermentar, as bactérias, leveduras e fungos transformam esta biomassa em constituintes de seu protoplasma ou metabolismo. Esses microrganismos são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, produção de gases e liberação de metabólitos, entre eles antibióticos e hormônios de crescimento (BETTIOL, 2003). A maior parte dos biofertilizantes produzidos tem como base os estercos de animais ruminantes, de preferência gado bovino de leite, por possuir um hábito alimentar mais balanceado e por suas fezes conterem grande diversidade de microrganismos, que vão acelerar e facilitar o processo de fermentação (SANTOS & AKIBA, 1996). Entretanto, diversos biofertilizantes são produzidos com esterco compostado, considerando principalmente os problemas de patógenos animais presentes nas fezes. Também outras matérias orgânicas são utilizadas na produção de biofertilizantes, tais como farelos de soja, algodão, milho e outros.

O biofertilizante líquido tem na sua composição quase todos os nutrientes necessários para a nutrição vegetal, variando as concentrações (SANTOS, 1992). Segundo Pinheiro e Barreto (2005), entre os componentes comuns nos biofertilizantes como aminoácidos e ácidos orgânicos, encontra-se tiamina, piridoxina, riboflavina, cobalaminas, ácido ascórbico e ácido fólico, entre outros. Quanto mais diversificada a matéria prima do biofertilizante, maior a possibilidade de liberação de diferentes substâncias orgânicas. O efeito de fontes de matéria orgânica na severidade de doenças de plantas depende do tipo de material utilizado, da relação C:N e do tempo decorrido da sua incorporação (BETTIOL & GHINI, 2003).

No biofertilizante, o esterco, ao entrar em processo fermentativo continua o catabolismo iniciado no estômago do animal, mas lentamente inicia-se o anabolismo, sintetizando novos elementos (PINHEIRO & BARRETO, 2005). Depois da digestão os resíduos oriundos das diferentes etapas da fermentação apresentam alta qualidade para uso como fertilizante agrícola, devido à diminuição do teor de C do material, pois a matéria orgânica ao ser digerida perde exclusivamente carbono na forma de  $\text{CH}_4$  e  $\text{CO}_2$ ; aumento do teor de N e demais nutrientes e redução na relação C:N; o que melhora as condições do material para fins agrícolas; maior facilidade de imobilização do biofertilizante pelos microrganismos do solo, devido ao material se encontrar em grau avançado de decomposição, o que vem aumentar a eficiência do biofertilizante e solubilidade parcial de alguns nutrientes (SEIXAS et al., 1980)

Ao pulverizar estes fermentados diluídos, nas folhas há uma absorção direta havendo menor gasto energético e sem incompatibilidades, pois com o metabolismo das bactérias, leveduras e fungos ocorre uma transformação dos materiais orgânicos, com maior equilíbrio dos micronutrientes e outros elementos, de forma próxima ao que ocorre no solo quando a matéria orgânica é decomposta pela microbiota (PINHEIRO & BARRETO, 2005). Além disso, a comunidade microbiana presente no biofertilizante é diversificada e colabora com a introdução de organismos benéficos para as plantas e para o agroecossistema.

De acordo com Bettioli et al. (1998), um dos biofertilizantes muito utilizado é o Supermagro, desenvolvido por Delvino Magro e agrônomos do Centro de Agricultura Ecológica Ipê - Rio Grande do Sul. Esse biofertilizante é enriquecido com leite, açúcar ou melaço, micronutrientes na forma de sais, resíduos de peixe, farinha de ossos, sangue e fígado entre outros materiais, aumentando, assim, o poder nutricional do produto final. O biofertilizante não tem, portanto, uma forma única de preparo. O Supermagro é utilizado com sucesso em culturas como maçã, pêssigo, uva, tomate, batata e hortaliças em geral (MEDEIROS et al., 2002).

Os biofertilizantes atuam também como defensivo natural por meio de bactérias benéficas, principalmente *Bacillus subtilis* (TRATCH & BETTIOLI, 1997), de grande importância no início da fermentação. A fermentação com *Bacillus subtilis* é usada milenarmente na Índia, mas foi no final da década de 50 que alguns pesquisadores estudando biofertilizantes oriundos de biodigestores, extraíram, através de N-Butanol, um complexo orgânico de forte poder bacteriostático e fungistático contra uma série de patógenos agrícolas (PINHEIRO & BARRETO, 2005). De acordo com os mesmos autores, o *Bacillus subtilis* produz, ainda, alfa-amilase importante para a absorção de Cálcio e Magnésio.

Segundo Medeiros (2002), os biofertilizantes também apresentam ação direta sobre ácaros e insetos pragas. Santos (1992) relatou efeitos inseticidas, acaricidas e repelentes ao biofertilizante líquido produzido com esterco bovino fresco. O autor destaca o efeito repelente e deterrente do biofertilizante contra pulgões e moscas da fruta. Medeiros (2002), estudando o efeito do biofertilizante sobre o ácaro *Brevipalpus phoenicis*, verificou que a sua ação sobre o número de ovos foi diretamente proporcional à concentração utilizada, evidenciando, a possibilidade de o biofertilizante possuir substâncias hormonais ou inibidores enzimáticos que afetam a reprodução e o metabolismo do ácaro. Uma substância diferente na dieta do ácaro pode ter afetado seu metabolismo que repercutiu sobre a sua fertilidade e também sobre a viabilidade dos ovos. O mesmo autor verificou ainda que a aplicação do biofertilizante, em associação com o fungo entomopatôgeno *Beauveria*

*bassiana*, reduziu em 42% a sobrevivência do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), importante praga de hábito polífago de ocorrência em hortaliças e olerícolas. A associação de biofertilizantes com os fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *Metharizium anisopliae* também tem sido utilizada, principalmente em cultivos de casas de vegetação no interior de São Paulo.

Diversos trabalhos mostram os efeitos dos nutrientes sobre as doenças de plantas e, conseqüentemente, a redução da necessidade de controle com uma equilibrada nutrição de plantas (BETTIOL & GHINI, 2003). Segundo Bettiol et al. (1998), os biofertilizantes apresentam potencial para o controle de doenças de plantas e podem agir por meio de antibiose (pela presença de antibióticos em sua composição); competição (presença da comunidade microbiana); indução de resistência (tanto microbiana como pelos compostos químicos presentes) e ação direta ou indireta no fornecimento de nutrientes às plantas. Os decompositores primários (principalmente bactérias e fungos) podem atuar como antagonistas de fitopatógenos por competição por nutrientes, antibiose e parasitismo, enquanto que a micro e mesofaunas podem contribuir para o controle por predação (VAN BRUGGEN, 1995). Essa autora concluiu que o desenvolvimento da proteção de plantas em sistemas alternativos de cultivo com maior grau de sustentabilidade, requer estudos sobre a estrutura e o funcionamento dos agroecossistemas, com atenção especial às condições nutricionais e à biota do solo, à diversidade funcional, à elevação dos teores de matéria orgânica do solo e outros fatores que permitam um adequado manejo dos sistemas produtivos.

Como o uso do biofertilizante se trata de uma técnica que vem sendo expandida, há necessidade de realização de estudos para a determinação dos seus impactos no ambiente e na saúde pública. Para minimizar os possíveis problemas sugere-se o uso de matéria orgânica livre de metais pesados e de agentes nocivos à saúde pública (BETTIOL, 2003). Segundo Kupper et al. (2005), estudos são necessários para determinar a concentração ideal e intervalo de aplicação dos biofertilizantes, também quanto ao seu modo de ação.

Tratch e Bettioli (1997) verificaram que em concentrações acima de 15% o biofertilizante inibiu completamente o crescimento *in vitro* da maioria dos fungos testados (*Alternaria solani*, *Stemphylium solani*, *Septoria lycopersici*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium*). Também observaram efeito de biofertilizante sobre o crescimento micelial e germinação de esporos, e em concentrações acima de 20% a germinação de conídios de *B. cinerea* e acima de 10% a de conídios de *A. solani* foram inibidos quase que completamente. Os mesmos autores verificaram que os responsáveis tanto pela inibição do crescimento micelial como pela germinação dos conídios foram os metabólitos dos biofertilizantes. Bettioli (1996) verificou que em concentrações acima de 10%, com pulverizações a cada dois dias, houve controle do oídio em abóboras e quanto menor o período entre as aplicações, mais efetivo o controle. McQuilken et al. (1994) verificaram inibição do crescimento micelial e da germinação de conídios de *Botrytis cinerea* usando extrato de esterco de cavalo e aves, controlando a doença em feijão, alface, tomate e pimentão.

Um dos possíveis mecanismos envolvidos no controle de fitopatógenos é a resistência induzida pelos microrganismos presentes no biofertilizante. De acordo com Kupper et al. (2005), existe potencial de que esses microrganismos atuem mecanismos de resistência quando aplicado o biofertilizante em plantas de citros. A indução de defesa do hospedeiro pode ocorrer também pela presença de macro e micronutrientes e compostos orgânicos. De acordo com Bettioli (1998), os nutrientes minerais exercem valiosas funções no metabolismo vegetal, influenciando não somente o crescimento vegetal e a produção da planta como, o aumento ou a redução na resistência a determinados patógenos.

Outra possibilidade é o enriquecimento do biofertilizante com microrganismos de conhecido efeito antagônico sobre fitopatógenos, como relatado por Hayashida et al. (1989) que, usando um biofertilizante produzido a partir de esterco de suíno inoculado com *Streptomyces albidoflavus*, obtiveram uma redução de 93% na área lesionada por *Streptomyces scabies* em batata. Essa possibilidade de enriquecer os biofertilizantes deve ser considerada para as

condições brasileiras. Também Medeiros (2002) sugere a associação de biofertilizantes com fungos entomopatogênicos, como *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae*, principalmente em cultivos de casas de vegetação.

A comunidade de microrganismos presentes no biofertilizante é rica, possibilitando a ação simultânea de diversos organismos sobre os fitopatógenos. Kupper et al. (2005) verificaram que o uso de biofertilizante foi efetivo no controle de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citrus. Esses produtos estão sendo utilizados na produção de diversas culturas no sistema orgânico ou em sistemas que buscam explorar as interações biológicas (BETTIOL & GHINI, 2003).

## **2.2 Controle biológico de doenças de plantas**

De acordo com Cook e Baker (1983), “controle biológico é a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença provocada por um patógeno, realizada por ou através de um ou mais organismos que não o homem.” Nessa abordagem, é levada em conta a complexidade entre as interações patógeno-planta-antagonista.

O termo antagonista é empregado para designar agentes biológicos com potencial para interferir nos processos vitais dos patógenos, estando esses agentes adaptados ecologicamente ao mesmo nicho que os ocupados pelos patógenos (MORANDI et al., 2009). De acordo com esses autores, o controle biológico pode ser acompanhado por práticas culturais, para criar um ambiente favorável aos antagonistas e à resistência da planta hospedeira, bem como pelo melhoramento da planta, para aumentar a resistência ao patógeno ou adequar o hospedeiro para as atividades dos antagonistas.

Os principais mecanismos envolvidos no controle biológico são: antibiose, competição, predação, parasitismo e indução de resistência de plantas. Segundo Bettiol (1991), um antagonista pode agir através de um ou mais mecanismos de interação, isso aumenta suas chances de sucesso. As informações sobre os mecanismos de ação entre os antagonistas são importantes para o desenvolvimento de estratégias de sucesso no biocontrole. Tais informações são essenciais para a otimização dos métodos e épocas de

aplicação do antagonista, desenvolvimento de formulações apropriadas para melhorar a eficácia e seleção do antagonista e para o registro desses agentes para uso comercial (DROBY & CHALUTZ, 1994).

O controle biológico pode ser aplicado contra qualquer tipo de microrganismo, seja vírus, fungo ou bactéria. Entretanto, uma maior atenção tem sido dada aos fungos, por serem em parte mais facilmente controlados por outros microrganismos (MORAES, 1992) e devido ao interesse na obtenção de produtos comerciais à base de fungos para controle biológico de patógenos habitantes do solo (BETTIOL et al., 2009). Ao se usar um microrganismo como agente de biocontrole, em algumas situações, é possível que ocorra o controle biológico por antagonismo direto do agente de biocontrole sobre o fitopatógeno, porém, não se descarta a possibilidade de ambas as situações – indução de resistência e antagonismo direto virem a acontecer ao mesmo tempo (KLOEPPER, 2005).

A indução de resistência ocorre quando há o aumento da capacidade defensiva de uma planta quando essa é corretamente estimulada (VAN LOON et al., 1998). De acordo com esses autores, todas as plantas possuem mecanismos de defesa contra fitopatógenos. Estes mecanismos falham quando a planta é infectada pelo patógeno porque ele cessa o desencadeamento das reações de resistência. Se os mecanismos de defesa são acionados por um estímulo antes da infecção por um patógeno, a doença pode ser reduzida. A indução de resistência ocorre naturalmente, como um resultado da infecção pelo patógeno. O fenômeno de indução de resistência pode ser dividido em duas categorias SAR (Resistência sistêmica adquirida) e ISR (Resistência sistêmica induzida) (GARCIA, 2008).

SAR é um mecanismo que envolve proteínas relacionadas com patogênese (PRPs) como mecanismos induzidos de defesa da planta. Sua indução é salicilato-dependente, pode resultar em necroses na planta que sofreu indução e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos (ROMEIRO, 2007). No caso de ISR, não há acúmulo de PRPs, a planta que sofreu indução não exhibe alterações, o agente indutor não é salicilato-dependente, parecendo

haver outra rota de sinalização mais associada à jasminatos e etileno (ROMEIRO, 2007).

Algumas enzimas como  $\beta$ -1,3-glucanase, peroxidase, quitinase, fenilalanina-amônio liase e lipoxigenase são relacionadas como indicadoras do estado de indução. Segundo Romeiro (2007), plantas expostas a eliciadores de resistência apresentam por consequência aumento nas atividades de enzimas envolvidas na síntese de componentes da resistência que se expressa. De acordo com esse mesmo autor, se a resistência induzida aumenta a atividade de determinadas rotas metabólicas específicas, o estado de indução de plantas expostas a agentes indutores pode ser confirmado por meio da análise da atividade de enzimas chaves envolvidas nessas rotas.

### **2.2.1. Leveduras do filoplano no controle biológico de doenças de plantas**

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são os colonizadores principais da parte aérea de plantas (JACQUES & MORRIS, 1995), sendo as bactérias e leveduras presentes normalmente em maior número (LAST & DEIGHTON, 1965). As leveduras habitantes do filoplano são encontradas numa variedade de folhas podendo existir tanto em pequenas colônias, como células isoladas concentradas na epiderme das mesmas (DOWDING & RICHARDSON, 1990). Esses organismos colonizam as folhas desde o início de seu desenvolvimento e formam uma barreira natural na sua superfície, sendo responsáveis pelo controle biológico natural de diversas doenças foliares e inclusive utilizados como agentes de biocontrole de fitopatógenos. De acordo com Droby et al. (2003), diversas leveduras foram registradas como agentes de controle de patógenos de pós-colheita, pela sua ocorrência natural e capacidade de colonização de ferimentos nas superfícies de frutas.

As leveduras agem principalmente por competição de nutrientes e indução de resistência. Por serem eficientes colonizadores de superfícies, são capazes de consumir nutrientes mais rapidamente do que os fungos fitopatogênicos (DROBY & CHALUTZ, 1994). De acordo com Castoria et al. (1997), além da competição por nutrientes, os mecanismos de ação dessas leveduras são baseados nas interações diretas com hifas fúngicas e produção de enzimas

líticas da parede celular. Esses mesmos autores relataram a atividade da glucanase em dois isolados de leveduras na presença de *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*. Também Allen et al. (2004) verificaram, por meio de testes *in vitro*, a habilidade de leveduras do filoplano atacar *B. cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia homeocarpa*. Buck (2002) relatou uma redução no desenvolvimento de lesões causadas por *B. cinerea* em gerânio (*Pelargonium hortorum*) quando co-inoculada com *Rhodosporidium toruloides*.

O uso de antagonistas no controle de doenças depende do incremento nas populações de saprófitas na folha, quando tais densidades não são naturalmente suficientes (FOKKEMA et al., 1979). Segundo Fokkema et al. (1975), um problema para o sucesso de leveduras no controle biológico é a dificuldade em manter altas populações na superfície da planta.

Segundo Boekhout e Nakase (1998) e Bai et al. (2002), *Sporobolomyces roseus* corresponde em muitos aspectos à *Sporobolomyces shibatanus*, o anamórfico de *Sporidiobolus pararoseus*. Em um estudo prévio, Gildemacher et al. (2004) identificaram isolados de leveduras por meio de métodos tradicionais utilizando características fisiológicas e morfológicas. Recentemente, tornou-se claro que isso pode resultar em identificações errôneas e todos os isolados de leveduras foram re-identificados usando a sequência de análises do domínio D1/D2 e da região ITS do gene rRNA (GILDEMACHER et al., 2006).

*Sporobolomyces roseus* e *Sporidiobolus pararoseus* apresentam potencial como agente de biocontrole. Sharma et al. (2008) relataram o potencial antagonico de *S. pararoseus* no controle de *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum* e *Alternaria alternata* em frutos de “Kinnow” (*Citrus nobilis* Lour. x *Citrus deliciosa* Tan.). Janderová et al. (1995) e Sharma et al. (2008) verificaram que alguns isolados produzem toxinas que inibem o crescimento de outros fungos.

Os nutrientes são fatores limitantes para o desenvolvimento de comunidades de leveduras na superfície das folhas e a aplicação de nutrientes exógenos pode resultar numa rápida colonização e aumento da população aderente (BUCK & ANDREWS, 1999). Buck (2002) verificou que a adição de nutrientes pode estimular populações de leveduras a níveis suficientes para aumentar a

atividade do controle biológico. A superfície de flores e frutos são fontes de substrato para leveduras, onde se encontram exsudados foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, açúcares e outras substâncias. Fokkema et al. (1979) observaram um incremento na comunidade de leveduras na superfície de folhas com aplicação de sacarose a 2% e extrato de levedura a 0,1%.

A aplicação de agrotóxicos e fertilizantes, bem como de outros poluentes pode facilmente alterar o equilíbrio da microbiota presente no filoplano e na maioria das vezes, as doenças são as principais consequências desse desequilíbrio (BETTIOL, 1991). Segundo Valdebenito-Sanhueza (2000), o uso de fungicidas para o controle das doenças nas culturas elimina parte da população que compete com outros componentes da microbiota epífita e, conseqüentemente, aumenta a disponibilidade de nutrientes para os patógenos. Gross e Kenneth (1972) verificaram que o tratamento de folhas de cevada com fungicidas inibiu o crescimento e a esporulação de *S. roseus*. Gildemacher et al. (2004), em um estudo sobre a suscetibilidade de leveduras a fungicidas, verificaram redução na população das leveduras em frutos de maçã pulverizados com captan e dithianon.

A fim de minimizar o impacto dos agrotóxicos sobre a comunidade de organismos dos sistemas agrícolas estão sendo adotadas medidas que possibilitem a sua racionalização, redução ou eliminação. Uma das alternativas para uma agricultura saudável e não poluidora do ambiente é a integração de práticas agrícolas que induzam à supressividade aos patógenos. Nesse sentido, diversos agricultores recorrem a técnicas que permitem a produção sem o uso de agrotóxico, como a relatada para lírio por Wit et al. (2009). Nesse sistema de integração é utilizado um biofertilizante obtido da fermentação aeróbia de matéria orgânica compostada, agentes de biocontrole e de produtos biocompatíveis de baixa toxicidade, extratos de plantas e própolis. Na cultura do lírio, *Botrytis elliptica* é o agente causal da doença mais importante. Entretanto, no caso do sistema apresentado por Wit et al. (2009) essa doença é mantida em níveis baixos sem a necessidade do uso de fungicidas. Foi levantada a hipótese de que as leveduras são uma das responsáveis por esse equilíbrio.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento de leveduras do filoplano de lírios produzidos no sistema convencional e sem uso de agrotóxicos

Para este estudo coletaram-se lírios da variedade Orange pixie, no estágio de botão floral, de duas propriedades no município de Holambra, Estado de São Paulo, sendo uma convencional e a outra com produção sem o uso de agrotóxicos (WIT et al., 2009). Na convencional as plantas foram tratadas com mistura de diversos inseticidas e fungicidas, entre eles captan, iprodione, mancozeb, tiofanato metílico, mancozeb + metalaxyl-m, imidacloprid, abamectina, deltametrina e paratiom metílico. Na produção sem o uso de agrotóxicos as plantas foram tratadas com agentes de controle biológico (*Trichoderma* spp., *Clonostachis rosea*, *Beauveria basiana*, *Metharizium anisopliae* e *Bacillus thuringiensis*); biofertilizante produzido aerobicamente com composto orgânico, melão e húmus de minhoca; extrato de alho, pimenta e própolis (WIT et al., 2009).

O isolamento das leveduras colonizadoras do filoplano foram realizados utilizando-se a técnica de queda dos balistosporos (“Spore-fall method”) em meio de cultivo (DOWDING & PEACOCK, 1991). Para tanto, foram selecionadas sete plantas ao acaso de cada tratamento, sendo divididas em terço superior, médio e inferior para a realização dos estudos. Com auxílio de um furador de 0,9 cm de diâmetro foram retirados 10 discos das folhas de cada

altura das plantas e fixados com auxílio de vaselina cinco discos de cada face (adaxial e abaxial) na tampa das placas de Petri, contendo no fundo o meio extrato de malte (15 g de extrato de malte; 12 g de ágar e 600 ml de água), sob condições assépticas. As placas foram mantidas à temperatura ambiente (25°C) por 24 h, quando foram dados leves toques na tampa das placas para auxiliar a liberação dos balistosporos. A avaliação foi realizada após 72 h contando-se o número de colônias de leveduras nas projeções dos discos com auxílio de microscópio estereoscópio. Colônias de leveduras foram repicadas para placas de Petri para purificação e preservadas em meio sólido. Com as mesmas plantas, após uma semana, foi repetido o procedimento para verificar possíveis alterações na comunidade de leveduras nas folhas.

A identificação das leveduras foi realizada por meio do sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do DNA ribossomal, de acordo com metodologia descrita por Medeiros et al. (2008).

### **3.2 *Sporidiobolus pararoseus* no controle biológico de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio e morango**

Para este estudo foi utilizada a levedura *S. pararoseus* isolada no experimento anterior, item 3.1. No primeiro experimento foram utilizados lírios da variedade Orange pixie produzidos sem uso de agrotóxicos.

Discos das folhas foram retirados e desinfestados com hipoclorito de sódio (1 min), álcool 70% (1 min) e água destilada esterilizada (1 min). Após a desinfestação, os discos foram separados por tratamento, sendo os mesmos transferidos para caixas gerbox. No terceiro dia após a inoculação do patógeno, foram colocados 10 discos em placas de Petri contendo o meio PCA (paraquat chloramphenicol ágar) para cada tratamento. A primeira avaliação foi realizada quatro dias após a inoculação e as demais avaliações a cada dois dias até o décimo segundo dia. Para a avaliação foi utilizada uma escala com oito categorias (PENG & SUTTON, 1991) e porcentagens de áreas de discos colonizados por *B. cinerea* [nota 0 (0%); 1 (0-3%); 2 (3-6%); 3 (6-12%); 4 (12-25%); 5 (25-37%); 6 (37-50%) e 7 (>50%)] (MORANDI et al., 2000; MORANDI

et al., 2007, adaptado) sendo calculada a área abaixo da curva de esporulação (AACE).

O experimento foi constituído de treze tratamentos com três repetições cada. A levedura foi aplicada nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  esporos/ml e três períodos de dispensa (levedura antes, simultaneamente e após a inoculação com *B. cinerea* na concentração de  $10^4$  esporos/ml). Além desses tratamentos, foi dispensada a levedura sem o patógeno nas três concentrações e somente o patógeno.

No segundo experimento, foram utilizadas folhas de morango de produção orgânica seguindo a metodologia descrita para o primeiro experimento. Sendo utilizada a escala de nota [nota 0 (0%); 1 (1-3%); 2 (4-6%); 3 (7-12%); 4 (13-26%); 5 (27-53%); 6 (54-76%) e 7 (77-100%)] (MORANDI et al., 2000; MORANDI et al., 2007) e sendo calculada a área abaixo da curva de esporulação (AACE).

### **3.3 Inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro por *Sporidiobolus pararoseus***

Com uma alça de semeadura contendo células de *S. pararoseus* foi feita uma estria em placas de Petri de 9 cm de diâmetro contendo o meio BDA a 2 cm da borda da placa (FIALHO, 2004). Um disco de micélio (0,6 cm) de *B. cinerea* foi posicionado na extremidade oposta da placa. O controle consistiu de uma placa contendo um disco de micélio do patógeno na ausência da levedura. As placas foram mantidas em temperatura ambiente e durante sete dias foi acompanhado o crescimento micelial do fungo. Foi avaliada a presença ou ausência da formação de alo de inibição. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições.

### **3.4 Comunidade microbiana epifítica da planta de lírio convencional e sem uso de agrotóxicos e dos biofertilizantes**

Para determinação da comunidade microbiana epifítica total das folhas de lírio cultivados no sistema convencional e sem o uso de agrotóxicos foi utilizado o

método de diluição seriada e plaqueamento em meios seletivos. Para tanto, foram coletadas 10 folhas do terço mediano das plantas de lírio. As folhas foram colocadas em erlenmeyers contendo 100 ml de solução salina 0,8% e em seguida em ultrassom durante 5 min e agitação em shaker durante 20 min. Foi retirada uma alíquota de 1 ml da suspensão e dispensada em tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina 0,8%, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$ . A partir desta diluição foram preparadas as diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ . Após homogeneização, com auxílio de pipetador automático, foram distribuídos 100  $\mu$ l de cada diluição sobre o meio agarizado e uniformizado com alça de Drigalski. As placas de petri foram invertidas e colocadas em sala com temperatura ambiente. Para contagem de fungos, bactérias, leveduras e *Bacillus* spp. foram utilizados os meios de Martin, nutriente ágar, YMA e nutriente ágar, respectivamente. Para a contagem de *Bacillus* as suspensões foram aquecidas a 80°C por 20 min em banho Maria antes do plaqueamento. A avaliação foi realizada 24-48 h após a transferência da suspensão por meio da contagem do número de colônias em cada placa. Os valores foram convertidos para unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). Foram utilizadas três placas para cada diluição.

Para a determinação da comunidade de bactérias totais e *Bacillus* spp. dos biofertilizantes foi utilizado o método de diluição seriada em meio seletivo e avaliado dois biofertilizantes (Biof J e Biof A). O Biof J foi produzido a partir de húmus de minhoca, levedo de cerveja, farelo de osso, composto orgânico e melão. O Biof A foi produzido a partir de esterco de suíno, cama de frango, composto de peixe, calcário de concha, levedo de cerveja e açúcar. Os dois biofertilizantes foram produzidos em fermentadores com aeração contínua por 18 horas. De cada biofertilizante foram retiradas alíquotas de 10 ml e diluídas em 90 ml de água destilada autoclavada, obtendo-se uma diluição  $10^{-1}$ . A partir desta diluição, foram retiradas alíquotas de 1 ml e diluídas em 9 ml de água destilada esterilizada, obtendo-se as diluições  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$ . Para a contagem de *Bacillus* spp., as diluições de  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$  foram colocadas em banho-maria a 80°C durante 20 min (BETTIOL, 1995). Após a homogeneização, com auxílio de pipetador automático, foram distribuídos 100

µl de cada diluição sobre o meio NA (nutriente ágar) e uniformizado com alça de Drigalski. As placas de petri foram invertidas e colocadas em sala com temperatura ambiente. A avaliação foi realizada 24-48 h após, contando-se o número de colônias em cada placa. Com os valores foram calculadas as unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml). Foram utilizadas três placas para cada diluição.

### **3.5 Atividade enzimática em extratos foliares de plantas de lírio desenvolvidas no sistema convencional e sem uso de agrotóxico**

Para o estudo foram utilizados 12 vasos com três plantas de lírio cada, produzidas sem o uso de agrotóxicos e 12 produzidas no sistema convencional. As plantas foram separadas em quatro lotes de três vasos cada. Assim, cada amostra foi composta por três vasos com três plantas cada e foram coletadas seis folhas por planta, sendo duas folhas de cada terço (superior, médio e inferior). Para o preparo do extrato foliar foram pesados cerca de 7,0 g de folhas correspondentes às plantas do sistema integrado. Essa massa foliar foi triturada na presença de N<sub>2</sub> líquido. Ao pó foi adicionado 28 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,0, acrescido de fluoreto de fenilmetilsulfolina (PMSF) 1 mM (0,560 mL de solução estoque PMSF 50 mM) e benzamidina (0,560 mL de solução estoque benzamidina 50 mM). Após uma nova maceração na presença do tampão e dos inibidores de proteases foi adicionado ao extrato 0,560 g de polivinil polipirrolidona (PVPP) 2% (g/v). O extrato foi misturado e centrifugado a 20.000 g por 25 minutos a 4<sup>o</sup>C. O sobrenadante, denominado de extrato vegetal, foi utilizado nos experimentos de cinéticas das enzimas Lipoxigenases (AXELROD et. al., 1981), Peroxidases (HAMMERSCHMIDT et. al., 1982), Fenilalanina amônio-liase (PASCHOLATI et. al., 1986) e β-1,3-glucanases (LEVER, 1972) de acordo com o protocolo utilizado pelo BIOAGRO - Laboratório de Proteômica da Universidade Federal de Viçosa.

Para todas as enzimas estudadas, os valores de absorvância foram plotados em um gráfico em função do tempo, para observar a linearidade para realização dos cálculos de atividade enzimática. De acordo com os resultados

do gráfico, foram adotados os intervalos de tempo de 30 segundos e 5 minutos e 30 segundos para Lipoxigenase, 30 segundos e 6 minutos e 30 segundos para Peroxidase, 30 segundos e 12 minutos e 30 segundos para Fenilalanina amônio-liase e 30 segundos e 30 minutos e 30 segundos para  $\beta$ -1,3-glucanase, para realização dos experimentos de avaliação da atividade das enzimas indicadoras.

### **3.6 Efeito de materiais orgânicos e biofertilizantes no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos**

Para este estudo foram utilizados os materiais orgânicos utilizados na fermentação para produção dos biofertilizantes Biof J e Biof A. Dessa forma, foram analisados o húmus de minhoca (HM), a cama de frango (CF), o esterco de suíno (ES) e o meio de cultura para microrganismos formulado à base de farelo de osso e levedo de cerveja (FOLC). Cada material orgânico foi diluído em água na proporção 3:1 (três partes de água para uma de composto orgânico). Após a mistura com água, o material foi autoclavado durante 1 h a 120°C. Após a autoclavagem, o material foi filtrado em gaze e algodão com auxílio de uma bomba de vácuo até que o material ficasse sem partículas sólidas. Após a filtragem os extratos foram separados em erlenmeyers de 250 ml e preparados os meios, extrato aquoso dos materiais orgânicos + BDA em diferentes concentrações: 0% (BDA), 10% (90% BDA e 10% do extrato), 20%, 30% 40% e 50%, com as respectivas quantidades de cada material. Os pHs dos meios foram corrigidos para o mesmo pH do BDA, antes da autoclavagem (pH=6). Depois de preparado os respectivos meios, os mesmos foram autoclavados e vertidos em placas de Petri de vidro de 9,0 cm diâmetro. Discos de 7 mm de diâmetro de *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum* e *Sclerotium rolfsii*, obtidos de colônias em pleno desenvolvimento, foram transferidos para o centro das placas. Para cada tratamento foram utilizadas três placas por patógeno e o crescimento micelial foi medido diariamente até que o patógeno atingisse uma das extremidades do tratamento com BDA. Para a avaliação, foram feitos dois traços perpendiculares no fundo das placas de Petri e determinado o diâmetro da colônia entre essas duas linhas.

O mesmo procedimento foi realizado com os biofertilizantes (Biof. J e Biof. A), porém, os mesmos foram diretamente adicionados ao BDA para preparo dos meios, pois se encontravam na fase líquida.

### **3.7 Efeito do biofertilizante no controle de doenças de plantas**

Em todos os estudos descritos nesse item para o controle de doenças de plantas foram utilizados os biofertilizantes Biof. J e Biof. A.

#### **3.7.1 Tombamento causado por *Pythium* spp. em pepino**

Solo (60 kg) coletado na área experimental da Embrapa Meio Ambiente foi autoclavado durante três dias por 1 hora. Vasos de 500 ml foram devidamente lavados e desinfestados com hipoclorito de sódio (com 5% de cloro ativo) na concentração de 1:1 (v/v) e enxaguados com água e secos em temperatura ambiente para posterior uso. Com o solo esterilizado foram montados os vasos e posteriormente semeadas 10 sementes de pepino por vaso, lavadas para remoção do fungicida, perfazendo um total de 98 vasos. Um solo com histórico de *Pythium* foi coletado no Instituto Biológico de São Paulo, em Campinas. Esse solo foi separado em bandejas de plástico em 14 porções de 350 ml. Cada porção de solo, com exceção da testemunha absoluta (apenas solo), recebeu 70 g de farinha de aveia para estimular o desenvolvimento do patógeno. A mistura (solo + farinha de aveia) foi homogeneizada e umedecida de acordo com sua capacidade de campo, ficando incubada durante 48 h, mantendo sempre a mistura umedecida. Após esse período de incubação, foram adicionados os biofertilizantes em diferentes dosagens (0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 100%) e incubados durante sete dias, sempre mantendo a umidade da mistura (solo + aveia + biofertilizante). Em seguida, foram distribuídos esses substratos no colo das plantas de pepino na fase de folhas cotiledonares. Foram aplicados cerca de 50 ml da mistura por vaso, cobrindo toda sua superfície, anotando-se o número total de plantas saudáveis por vasos. A avaliação foi iniciada a partir do terceiro dia após a aplicação dos tratamentos, avaliando o número de plantas por vasos com tombamento.

### **3.7.2 Tombamento causado por *Sclerotium* spp. em pepino**

O solo foi preparado conforme item 3.8.1. Com o solo esterilizado foram montados os vasos e posteriormente semeadas 10 sementes de pepino por vaso, lavadas para remoção do fungicida, perfazendo um total de 180 vasos. Um solo com problemas de *Sclerotium* foi coletado numa horta de alface em Jaguariúna. Esse solo foi separado em bandejas de plástico em 16 porções de 500 ml. Cada porção de solo, com exceção da testemunha absoluta (apenas solo), recebeu 100 g de farinha de aveia. A mistura (solo + farinha de aveia) foi homogeneizada e umedecida de acordo com sua capacidade de campo, ficando incubada durante 48 h, mantendo sempre a mistura umedecida. Após esse período de incubação, foram adicionados os biofertilizantes em diferentes dosagens (0%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 100%) e incubados durante sete dias, sempre mantendo a umidade da mistura (solo + aveia + biofertilizantes). Em seguida, foram distribuídos esses substratos devidamente produzidos no colo das plantas de pepino na fase de folhas cotiledonares. Foram aplicados cerca de 50 ml da mistura por vaso, cobrindo toda sua superfície, anotando-se o número total de plantas sadias por vasos.

### **3.7.3 Controle do oídio (*Sphaerotheca fuliginea*) da abobrinha**

Plantas de abóbora (*Cucurbita pepo*), cv. Caserta foram cultivadas livres de inóculo de oídio em vasos de 3L contendo substrato comercial, adubadas de acordo com recomendação para cultura e irrigadas com solução nutritiva (condutividade 1,5  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) diariamente. Foram semeadas três sementes por vaso e, posteriormente realizado o desbaste das plantas deixando somente uma planta por vaso. Os vasos foram colocados em casa de vegetação com alto potencial de inóculo do patógeno. No experimento os dois biofertilizantes foram testados nas concentrações de: 0%; 12,5%; 25%; 50%; 75% e 100%. As plantas foram pulverizadas com os biofertilizantes semanalmente, até o ponto de escorrimento, totalizando cinco pulverizações. Foi realizada uma avaliação antes da primeira pulverização e as demais avaliações foram realizadas quatro dias após cada pulverização. As avaliações da porcentagem de área foliar com

sintomas da doença foram feitas uma vez por semana, sendo realizadas três avaliações no total. Com os dados foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença para cada concentração dos biofertilizantes. Além dos biofertilizantes, foi avaliado um tratamento controle (água) e outro com o fungicida fenarimol. O delineamento foi inteiramente casualizado com cinco repetições. Para pulverização os biofertilizantes foram preparados com água para obtenção das concentrações necessárias.

#### **3.7.4 Controle de *Cylindrocladium* spp. em *Spathiphyllum* sp.**

O substrato (MULTIPLANT<sup>®</sup>), utilizado para a produção de *Spathiphyllum*, foi infestado com uma suspensão de  $5,7 \times 10^5$  esporos/ml de *Cylindrocladium spathiphyli*, sendo utilizado 3L da suspensão para cada 100 vasos com 370 ml de substrato. O substrato infestado foi incubado durante três dias e adicionado os biofertilizantes nas concentrações de 0%, 25%, 50% e 100% do volume de água para atingir a capacidade de campo do substrato. Uma testemunha absoluta (substrato desinfestado) foi utilizada como padrão. A mistura foi incubada durante 7 dias quando foi realizado os enchimentos dos vasos e transplântio das mudas. Tanto o substrato como as mudas de *Spathiphyllum* foram fornecidas pelo produtor. A avaliação foi realizada por meio de notas de 1 a 3 (1- sadia, 2 - doente, 3 - morta) para as plantas. O delineamento foi em blocos ao acaso com cinco repetições.

#### **3.8 Efeito de biofertilizante na promoção de crescimento do feijoeiro**

Nos estudos foi utilizado como substrato subsolo do campo experimental da Embrapa Meio Ambiente. Os biofertilizantes avaliados foram o Biof. J e Biof. A. No primeiro ensaio, os biofertilizantes foram incorporados ao solo antes da semeadura e aplicados semanalmente no solo nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100% (v/v), utilizando um volume de água para atingir a capacidade de campo. Além dos biofertilizantes, metade dos vasos recebeu adubação com NPK, de acordo com as recomendações para a cultura do feijoeiro. Cada tratamento consistiu de 5 vasos de 3L com 10 sementes/vaso. As avaliações

foram realizadas aos 10 dias após emergência (DAE) avaliando-se a emergência, seguida pelo desbaste de oito plantas e avaliação do peso fresco e seco dessas plantas. A aplicação dos biofertilizantes no solo, nas diferentes concentrações, foi realizada a partir do 13° (DAE). Para as demais avaliações foram deixadas somente duas plantas por vaso e foram avaliados altura das plantas, tamanho de internódio, peso fresco e seco da parte aérea e raiz, área foliar e número de nódulos.

Para o segundo experimento, foram utilizados vasos de 1L e semeadas 5 sementes por vaso. As plantas foram pulverizadas semanalmente com os biofertilizantes utilizando um pulverizador manual com capacidade de 450 mL, até o ponto de escorrimento, nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 25, 50, 75 e 100% (v/v) a partir do 13° dia após a emergência (DAE). Todos os vasos receberam adubação com NPK de acordo com as recomendações para a cultura antes da semeadura. Cada tratamento consistiu de 5 repetições. As primeiras avaliações (emergência, peso fresco e seco) foram realizadas aos 10 (DAE), para tanto, foram retiradas três plantas e deixadas apenas duas para completar o ciclo. As avaliações foram as mesmas do experimento anterior.

### **3.9 Análises Estatísticas**

Nos itens 3.1 e 3.3 as análises foram qualitativas, desse modo, não foram realizadas análises estatísticas dos dados. Para os demais experimentos foram realizadas análises utilizando o Minitab 15 Statistical Software, exceto para o experimento com discos de folha de lírio no item 3.2, em que foi utilizado o pacote Statistical Analysis Systems (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Os dados de todos os experimentos foram examinados pela análise de variância (ANOVA) e as médias dos tratamentos comparados pelo teste Tukey (5%) e comparados pelo teste t (5%) nos itens 3.4 e 3.5.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento de leveduras do filoplano de lírios produzidos no sistema convencional e sem uso de agrotóxicos

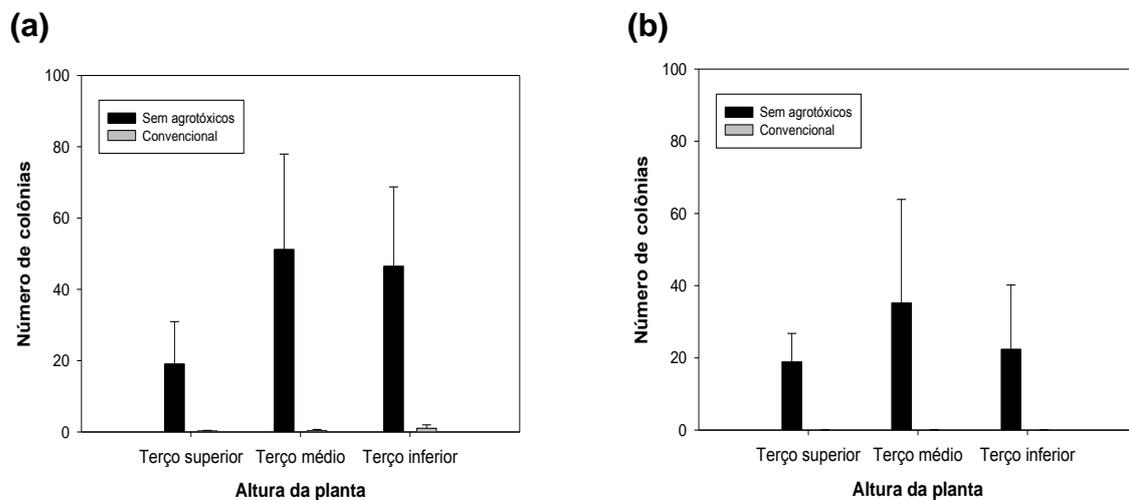
A comunidade de leveduras nas folhas de plantas de lírio produzidas sem o uso de agrotóxicos, em todas as alturas das plantas e face das folhas, foi significativamente maior do que as do sistema com uso de agrotóxico (Figura 1a e 2a). Transcorrida uma semana, o número de leveduras por discos de folha de lírio de plantas sem o uso de agrotóxicos continuou superior ao do sistema convencional, que tendeu a zero em todas as alturas (Figura 1b).

A reduzida população de leveduras nas plantas de lírio convencional em relação às sem o uso de agrotóxicos pode ser atribuída à sensibilidade dessas leveduras aos agrotóxicos, principalmente aos fungicidas. Texeido et al. (1999), analisaram o impacto de fungicidas aplicados em maçã e observaram uma redução significativa da população total de leveduras. Camatti-Sartori et al. (2006) isolaram leveduras de folhas de macieira nos sistemas convencional, integrado e orgânico e verificaram que a população de leveduras foi maior no sistema orgânico em comparação aos outros dois sistemas. Valarini e Melo (2006) verificaram em folhas de ipê (*Tabebuia* sp.) que a população de levedura reduzia conforme a proximidade da região central da cidade. Esses estudos mostram a sensibilidade desses organismos a poluentes e os dados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os mesmos.

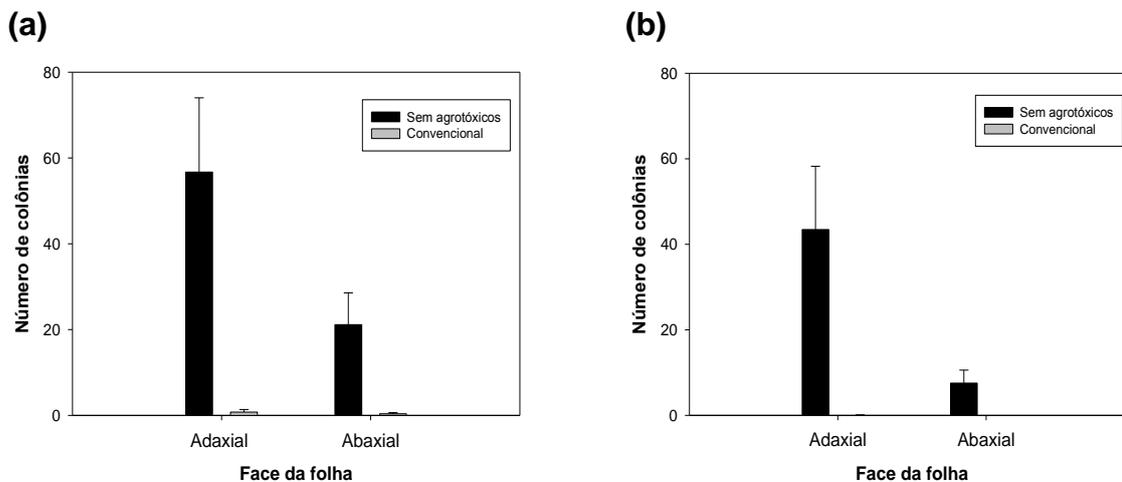
Segundo Last e Deighton (1965), há mudanças sucessivas no número de colônias de leveduras com a idade da folha, pois o número de colônias só aumenta depois que a folha atinge a primeira metade da sua vida. Só então os nutrientes são suficientes para sustentar o crescimento ou algum nutriente essencial é liberado, possivelmente pela proximidade da senescência. Essa informação está de acordo com o verificado no presente trabalho, no qual foi observada maior população de leveduras no terço mediano das plantas produzidas sem o uso de agrotóxicos (Figura 1a).

A população de leveduras observada em relação à face da folha, para os dois sistemas, foi maior na face adaxial (Figura 2). Entretanto, foi muito superior para as produzidas sem o uso de agrotóxicos. Em estudos sobre a distribuição de colônias de leveduras na superfície de folhas de gramíneas, Last e Deighton (1965) não encontraram diferenças entre as faces adaxial e abaxial. Porém, esses mesmos autores encontraram diferenças em crisântemo, onde um número maior de organismos foi encontrado na face abaxial em relação à face adaxial das folhas. Características de cada espécie de plantas devem interferir nessas informações.

Os isolados de levedura foram identificados como *Sporidiobolus pararoseus*. Esse gênero possui colônias de cor rosa e/ou avermelhada, podendo muitas vezes ser confundida com *Sporobolomyces roseus*. Segundo Fell e Tallman (1981), o gênero *Sporidiobolus* foi relatado por Nyland semelhante à *Sporobolomyces*, com exceção à presença de micélio dicariótico e teliosporos. No entanto, diferenciam em graus de assimilação de carbono e nitrogênio (BAI et al., 2002). No caso de *Sporidiobolus pararoseus* não há assimilação de nitrato (STATZELL-TALLMAN & FELL, 1998) e o contrário ocorre em *Sporobolomyces roseus*, onde há assimilação deste composto (BOEKHOUT & NAKASE, 1998).



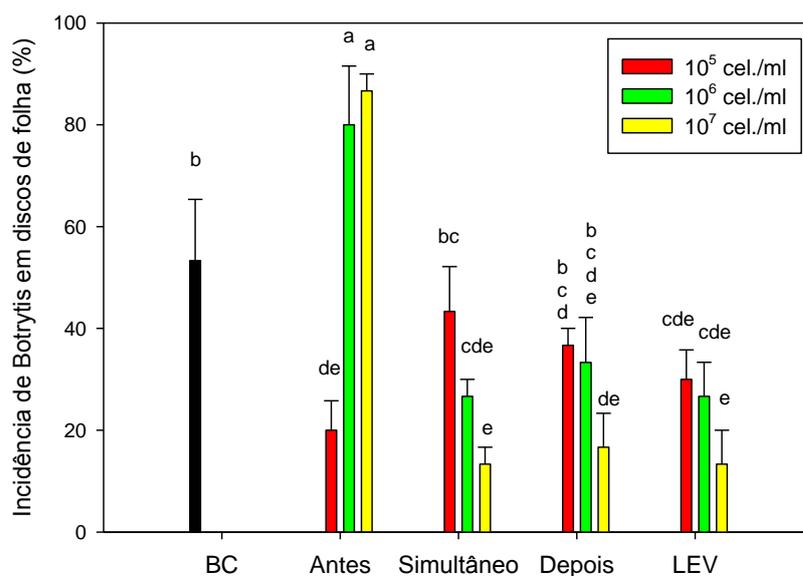
**Figura 1.** Número de colônias de leveduras em discos de folhas de lírio de plantas produzidas sem uso de agrotóxicos e convencional em relação à altura da planta, no momento da coleta (a) e uma semana após a primeira avaliação (b). As barras na vertical indicam o desvio padrão.



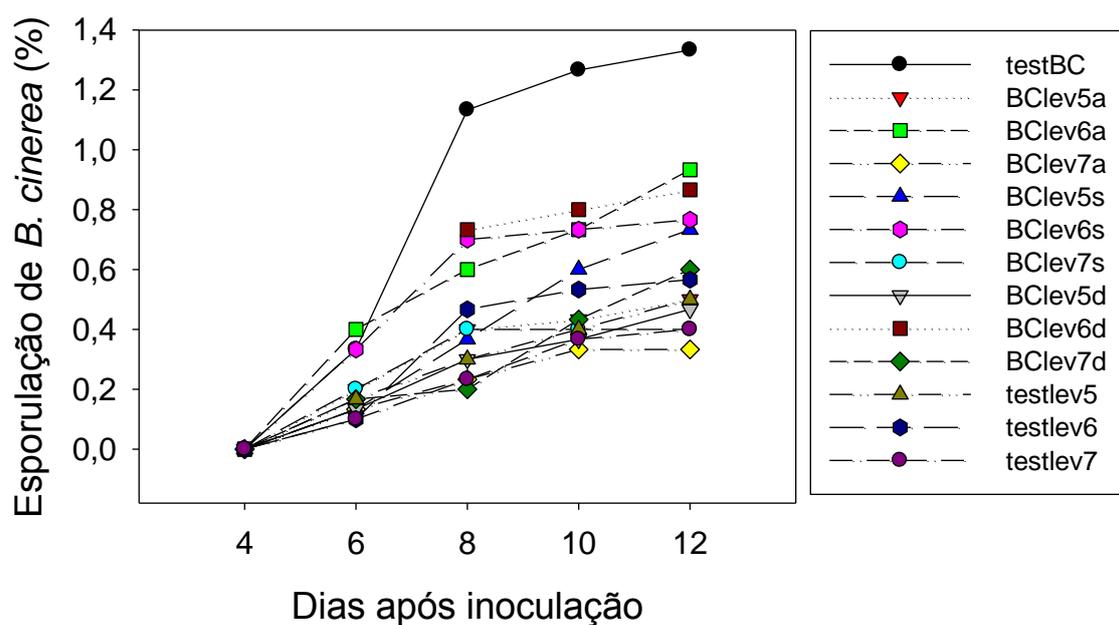
**Figura 2.** Número de colônias de leveduras em discos de folha de lírio de plantas produzidas sem uso de agrotóxicos e convencional em relação à face (adaxial e abaxial) das folhas, no momento da coleta (a) e após uma semana da primeira avaliação (b). As barras na vertical indicam o desvio padrão.

#### 4.2 Efeito de *Sporidiobolus pararoseus* no controle biológico de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio e morango

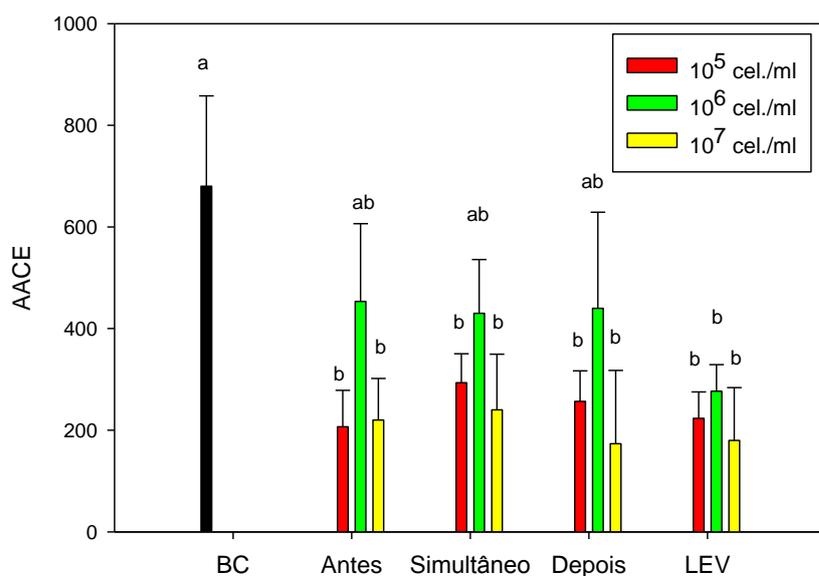
A incidência de *B. cinerea* nos discos de folha de lírio, com exceção da levedura nas concentrações de  $10^6$  e  $10^7$  esporos/ml dispensadas antes da inoculação de *B. cinerea*, foi reduzida em todos os tratamentos em relação à testemunha (Figura 3). Observou-se que, ao longo das cinco avaliações, a tendência foi de uma menor severidade da doença para todos os tratamentos que receberam a aplicação da levedura (Figura 4). A aplicação da levedura antes, simultânea e após a inoculação colaborou com a redução de sua esporulação. A concentração de  $10^6$ , em todos os períodos de dispensa, não diferiu da testemunha (Figura 5). Entretanto, não foi verificada diferença significativa entre os períodos de dispensa em relação a AACE.



**Figura 3.** Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação 24 h antes, simultânea e 24 h depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).



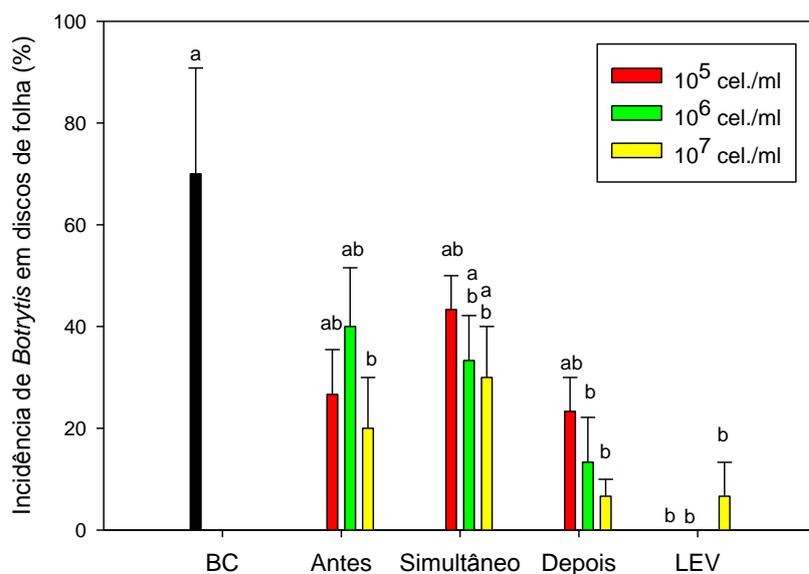
**Figura 4.** Severidade de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio no sistema integrado. BC = *B. cinerea*; lev 5, 6 e 7 = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; a, s, d = aplicação 24 h antes, simultaneamente e 24 h depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*.



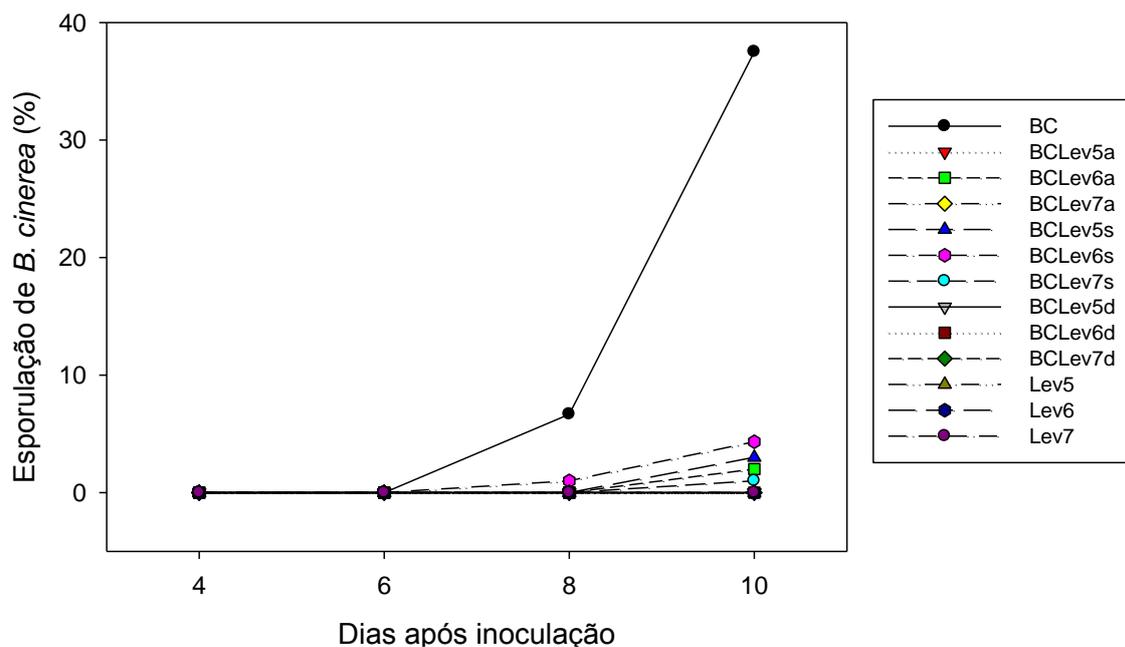
**Figura 5.** Efeito de *Sporidiobolus pararoseus* sobre a área abaixo da curva de esporulação (AACE) de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de lírio quando dispensadas antes, simultânea e após o patógeno. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação 24 h antes, simultânea e 24 h depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

No experimento utilizando discos de folha de morango, a incidência e severidade da doença e a esporulação do patógeno foram reduzidas com aplicações da levedura antes, simultânea e após a inoculação. A incidência de *B. cinerea* nos discos de folha de morango foi reduzida em todos os tratamentos em relação à testemunha. A levedura nas concentrações  $10^6$  dispensada depois e  $10^7$  dispensada antes e depois da aplicação de *B. cinerea* diferiram significativamente da testemunha (Fig 6). Na Figura 7, é possível observar uma menor severidade da doença para todos os tratamentos que receberam a aplicação da levedura. A partir da terceira avaliação, com oito dias após a inoculação, houve diferença significativa entre os tratamentos com relação a testemunha. Todas as concentrações para todos os períodos de dispensa diferiram significativamente da testemunha de *B. cinerea* contribuindo para a redução da esporulação. Entretanto, não foi verificada diferença significativa entre os períodos de dispensa em relação a AACE (Figura 8).

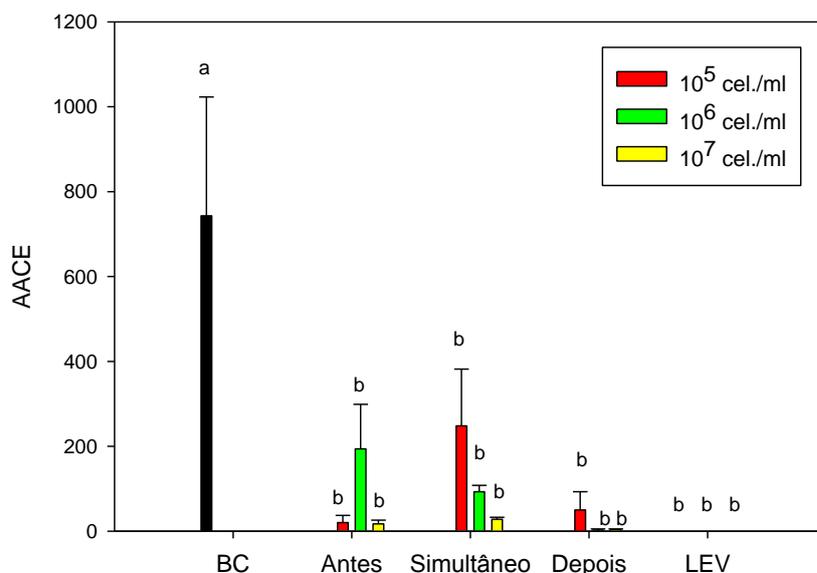
Os resultados dos experimentos corroboram com os demonstrados por Droby e Chalutz (1994) e El-Ghaouth et al. (2003). De acordo com esses autores, a atividade antagônica é mais eficaz quando a levedura é aplicada antes da infecção pelo patógeno. Um dos principais mecanismos de ação de leveduras contra *B. cinerea* é a competição por nutrientes (JANISIEWICZ et al., 2000). Os resultados destes trabalhos indicam que *S. pararoseus* apresenta potencial para reduzir a incidência e severidade de *Botrytis* nas plantas de lírio e morango, sendo fundamental manter elevada a sua população para atuar no controle biológico natural da doença, sendo esses resultados reportados também por Buck e Andrews (1999), Buck (2002) e Sharma et al. (2008). Esses resultados sugerem que o manejo integrado da cultura de lírio sem o uso de agrotóxicos, descrito por Wit et al. (2009), mantém elevada a população de leveduras nas folhas das plantas, destacando-se a *S. pararoseus*.



**Figura 6.** Incidência de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morango. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação antes, simultânea e depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).



**Figura 7.** Severidade de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morango. BC = *B. cinerea*; lev 5, 6 e 7 = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; a, s, d = aplicação antes, simultaneamente e depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*.



**Figura 8.** Efeito de *Sporidiobolus pararoseus* sobre a área abaixo da curva de esporulação (AACE) de *Botrytis cinerea* em discos de folhas de morango quando dispensadas antes, simultânea e após o patógeno. BC = *B. cinerea*; LEV = levedura nas concentrações de  $10^5$ ,  $10^6$  e  $10^7$  células/ml; Antes, Simultâneo, Depois = aplicação antes, simultânea e depois da levedura em relação à inoculação de *B. cinerea*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

#### **4.3 Inibição do crescimento micelial de *Botrytis cinerea* in vitro por *Sporidiobolus pararoseus***

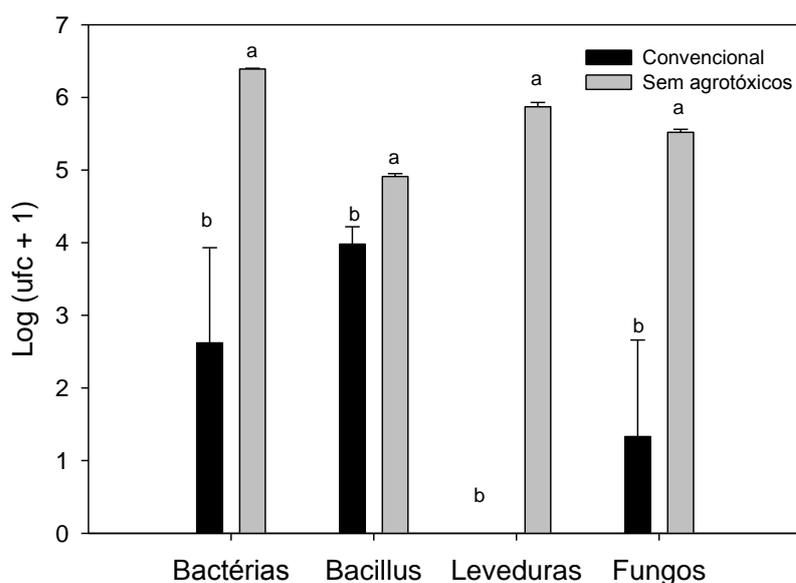
*Sporidiobolus pararoseus* não inibiu o crescimento micelial de *B. cinerea* em relação à testemunha. Esse resultado mostra que esta levedura não agiu por meio de antibiose sobre *B. cinerea*. Isso implica que a mesma deve possuir outro modo de ação sobre este fitopatógeno, sendo a competição o mais provável. De acordo com Janisiewicz et al. (2000) um dos principais mecanismos de ação de leveduras contra *B. cinerea* é a competição por nutrientes.

#### **4.4 Comunidade microbiana epifítica da planta de lírio convencional e sem agrotóxicos e dos biofertilizantes**

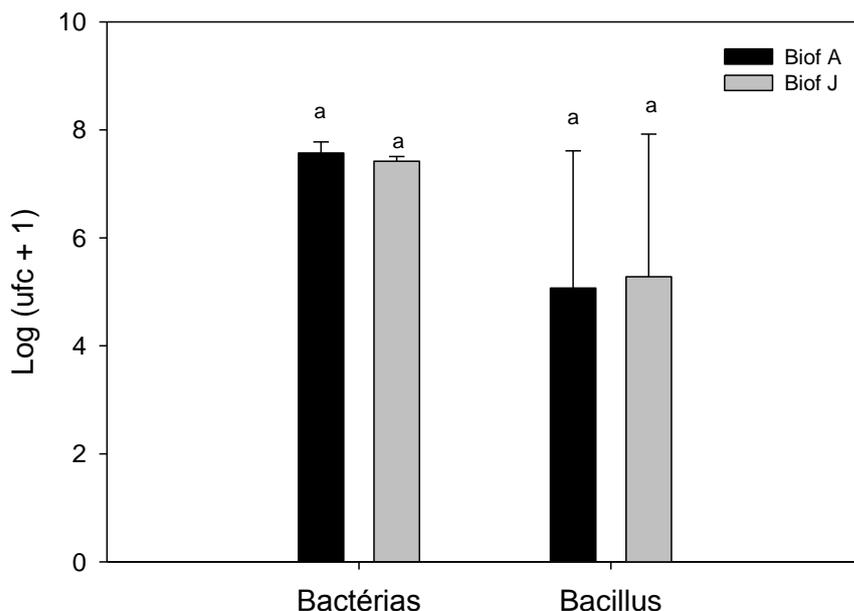
A comunidade microbiana de bactérias totais, *Bacillus*, leveduras e fungos filamentosos das folhas de lírio provenientes de plantas produzidas sem uso de agrotóxicos foi significativamente maior que as isoladas de folhas provenientes de lírio produzido no sistema convencional. As folhas de lírio no manejo convencional não apresentaram colônias de leveduras (Figura 9). A diferença entre a comunidade microbiana no filoplano de lírio produzido nos dois sistemas se deve a maior diversidade de microrganismos presentes nas folhas de plantas produzidas sem uso de agrotóxicos, como a relatada para lírio por Wit et al. (2009). Nesse sistema é utilizado, além do biofertilizante obtido da fermentação aeróbia da matéria orgânica compostada, agentes de biocontrole e produtos biocompatíveis de baixa toxicidade. O biofertilizante atua como fonte direta de microrganismos e como fonte de nutrientes para os mesmos. A reduzida população de microrganismos, principalmente de leveduras, nas plantas de lírio do sistema convencional em relação às produzidas sem agrotóxicos pode ser atribuída à sensibilidade desses organismos a esses produtos, principalmente aos fungicidas. O equilíbrio da comunidade microbiana do filoplano pode ser quebrado pela interferência humana, no que diz respeito à poluição e aplicação de produtos químicos como fungicidas, inseticidas, acaricidas, hormônios e fertilizantes (BETTIOL et al., 1991).

Não houve diferença significativa entre os biofertilizantes com relação à presença de bactérias totais e *Bacillus* (Figura 10). A comunidade de

microrganismos presentes nos biofertilizantes é rica, porém, acredita-se que a população total de microrganismos nos biofertilizantes seja mais elevada do que a indicada a partir de amostras plaqueadas, uma vez que em meios seletivos apenas uma parte da população existente se desenvolve (HERBERT, 1990) e não são avaliados aqueles microrganismos não cultiváveis que representam a maior parte dos microrganismos. Pupo et al. (2007) consideram que apenas cerca de 1% dos microrganismos são cultiváveis.



**Figura 9.** Comunidade de bactérias totais; *Bacillus*; leveduras e fungos de folhas de lírio convencional e sem uso de agrotóxicos em Unidade formadora de colônias (ufc/g). Médias seguidas de mesma letra não diferenciam entre si (Teste t 5%).



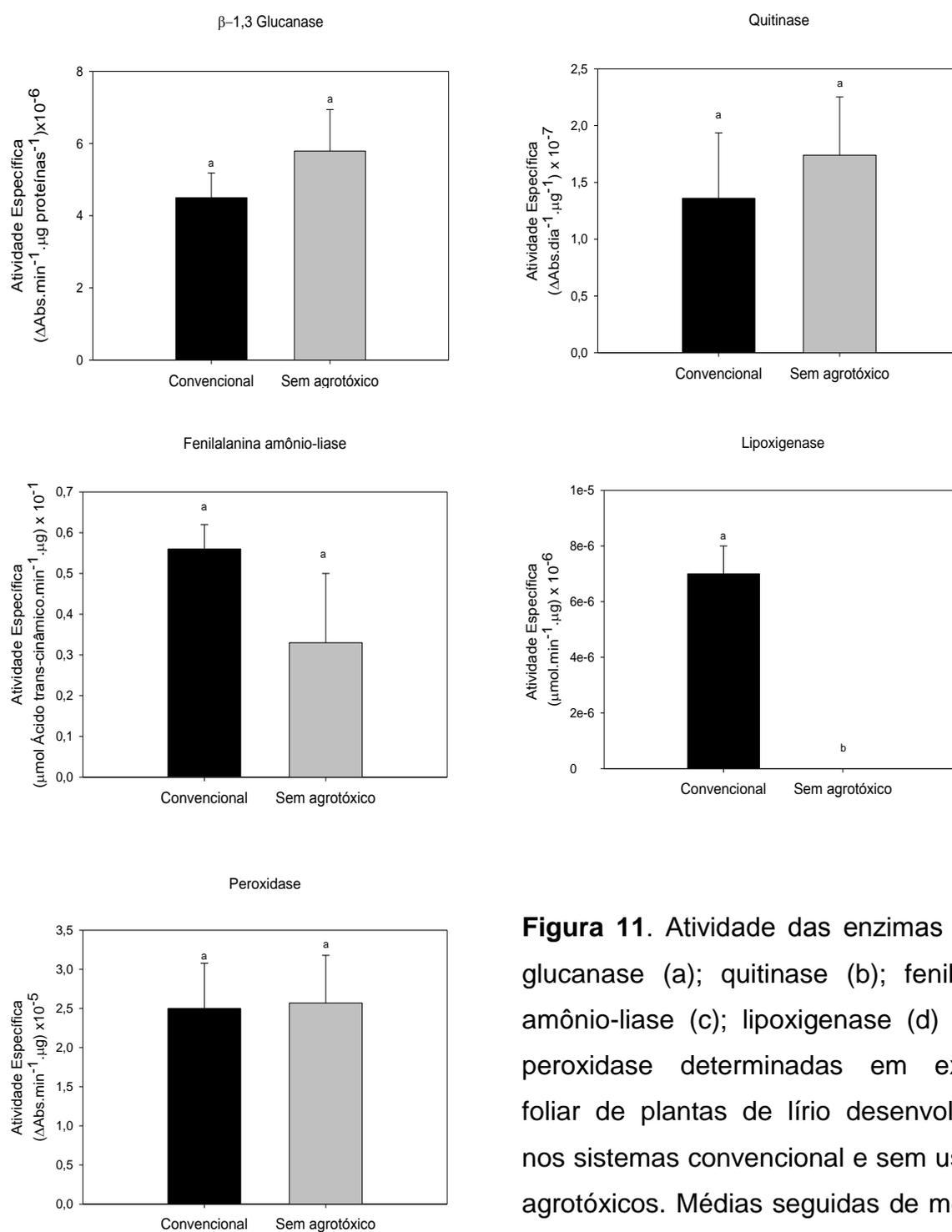
**Figura 10.** Comunidade de Bactérias totais e *Bacillus* em Unidade formadora de colônias (ufc) dos Biofertilizantes A e J. Médias seguidas de mesma letra não diferenciam entre si (Teste t 5%).

#### 4.5 Atividade enzimática em extratos foliares de plantas de lírio convencional e sem uso de agrotóxicos

Não houve diferença significativa entre as plantas de lírio desenvolvidas nos sistemas convencional e sem uso de agrotóxicos para as atividades específicas das enzimas analisadas (Figura 11), exceto para a lipoxigenase, em que as plantas produzidas sem agrotóxicos não apresentaram atividade desta enzima (Figura 11d).

Segundo Siedow (1991), a lipoxigenase está envolvida no crescimento e desenvolvimento da planta, senescência, sistemas de defesa contra fitopatógenos e síntese de moléculas regulatórias. Dentro de uma determinada planta o nível de atividade da lipoxigenase presente em qualquer tecido pode variar consideravelmente, não só entre os diferentes órgãos da planta, mas também entre os diferentes estádios de desenvolvimento. De acordo com esse mesmo autor, uma característica comum nos estudos realizados, é que o aumento na atividade da lipoxigenase que aparece no desenvolvimento da plântula dentro da primeira hora após a germinação é seguido por uma perda significativa durante as 48 h subsequentes.

A síntese de enzimas acarreta custos energéticos para a planta (GARCIA, 2008) e com o tempo sua síntese é diminuída. Em condições naturais, a resistência induzida somente é expressa na presença do patógeno, de modo que a planta não necessite deslocar recursos desnecessariamente (HEIL, 2002). A exposição da planta a eliciadores, sejam bióticos ou abióticos, acarreta uma resposta imediata dos tecidos, que reagem mais eficientemente às tentativas de colonização pelo patógeno (ROMEIRO, 2007). Para Xue et al. (1998), a resistência induzida é alcançada quando a planta é inoculada com um isolado não-patogênico antes ou concomitante à inoculação com o patógeno. De acordo com Romeiro (2007), há necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência, posto que a expressão dos genes ativados não pode, obviamente, ser imediata. Esse intervalo de tempo pode demorar de alguns dias a uma semana (HEATH, 1995).



**Figura 11.** Atividade das enzimas  $\beta$ -1,3 glucanase (a); quitinase (b); fenilalanil amônio-liase (c); lipoxigenase (d) e (e) peroxidase determinadas em extrato foliar de plantas de lírio desenvolvidas nos sistemas convencional e sem uso de agrotóxicos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Teste t 5%).

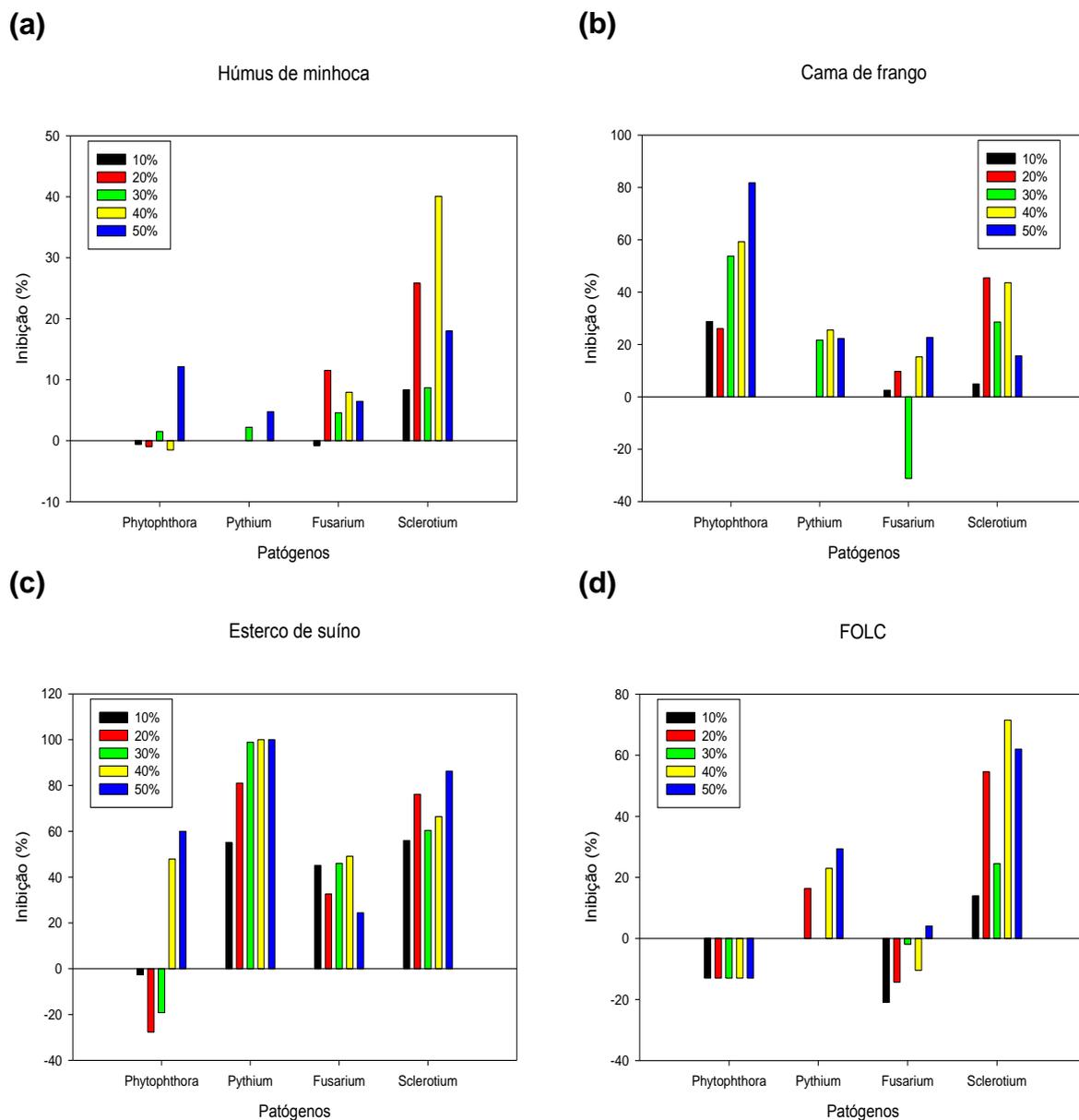
#### 4.6 Efeito de materiais orgânicos e biofertilizantes no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos

O extrato aquoso de esterco de suíno foi o que proporcionou a maior inibição do crescimento micelial para os quatro patógenos estudados (Figura 12c). Para *Pythium* spp. esse extrato nas diluições 30, 40 e 50 % inibiram o crescimento micelial em 99, 100 e 100%, respectivamente (Figura 12c). O crescimento de *Phytophthora* foi inibido pelo extrato de esterco de suíno apenas nas maiores concentrações, sendo a inibição de 50% na diluição de 40%. A inibição de *Sclerotium* foi em torno de 50% para todas as concentrações testadas do extrato aquoso de esterco de suíno. Por outro lado, a de *Fusarium* foi inferior a 50%. O extrato aquoso de húmus de minhoca não inibiu o crescimento micelial dos patógenos testados (Figura 12a). O extrato aquoso da cama de frango e do produto à base de farelo de osso e levedo de cerveja também não inibiram o crescimento micelial dos patógenos, com exceção de *Phytophthora* e *Sclerotium* para os extratos de cama de frango e farelo de osso e levedo de cerveja, nas maiores concentrações, respectivamente (Figuras 12bd). As menores concentrações de extrato aquoso do farelo de osso e de levedo de cerveja estimularam o crescimento de *Phytophthora* (Figura 12d).

Dos quatro materiais orgânicos analisados neste trabalho, somente apresentaram tendência de redução do crescimento micelial com o aumento da concentração da matéria orgânica, o esterco de suíno para o *Pythium* e a cama de frango para a *Phytophthora* (Figura 13). Os demais materiais não inibiram os fungos estudados.

De acordo com Hoitink e Fahy (1986) e Hoitink et al. (1996), em temperaturas acima de 60°C há perda de supressividade de compostos orgânicos para *Pythium* spp. e *Fusarium* spp. e muitos microrganismos benéficos são eliminados nesse processo. Neste trabalho, o efeito inibitório dos materiais orgânicos pode ter diminuído com a autoclavagem para a obtenção dos extratos aquosos. De acordo com Elad e Shtienberg (1994), a perda da capacidade inibitória com a autoclavagem ocorre em alguns casos. De acordo com Weltzien (1992), quanto maior o tempo de fermentação, maior a capacidade inibitória da matéria orgânica mesmo em altas temperaturas.

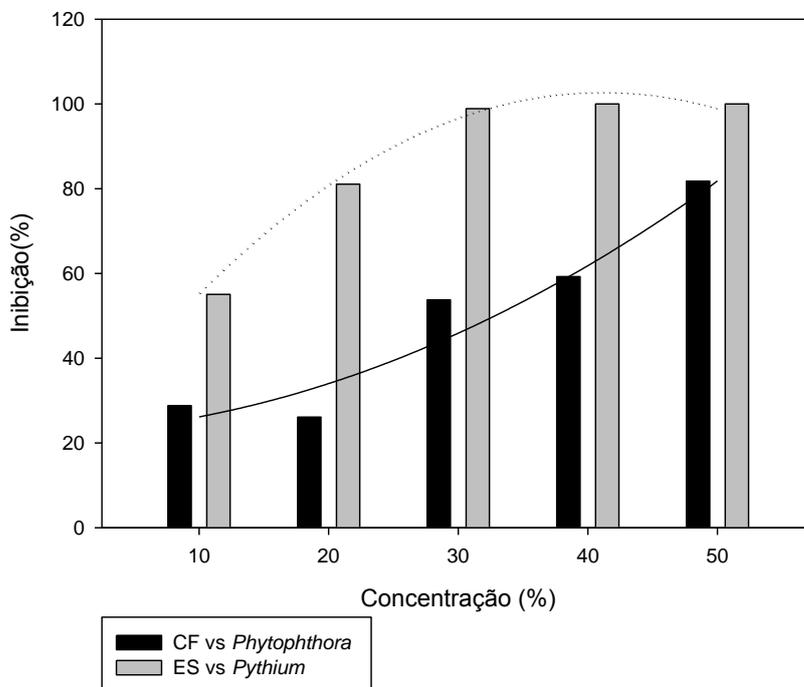
Segundo Fen et al. (1996), citado por Nakasone (1998), os efeitos inibitórios são aparentemente devidos a fatores abióticos, quando a inibição foi mantida após a autoclavagem dos extratos. Nelson e Hoitink (1983) observaram que o aquecimento de matéria orgânica a 60 e 121°C, seguido pela inoculação dois dias após estes tratamentos, resultaram em uma quantidade significativamente maior de tombamento causado por *Rhizoctonia solani* (63,1 e 78,7%, respectivamente). Visconti (2008) observou que não houve inibição do crescimento micelial de *Verticillium dahliae* e *Cylindrocladium spathiphylli* utilizando extratos aquosos de matéria orgânica autoclavados em comparação com os materiais orgânicos sem autoclavagem.



**Figura 12.** Efeito de extratos aquosos de matérias orgânicas utilizadas na produção de biofertilizantes sobre o crescimento micelial de *Phytophthora*; *Pythium*; *Fusarium* e *Sclerotium* [húmus de minhoca (a), cama de frango (b), esterco de suíno (c) e de um produto à base de farelo de osso e levedo de cerveja (FOLC) (d)].

$$\text{CF: } y = 0,22 + 0,002x + 0,0002x^2 ; R^2 = 0,93$$

$$\text{ES: } y = 0,20 + 0,04x - 0,0005x^2 ; R^2 = 0,99$$



**Figura 13.** Inibição do crescimento micelial de *Phytophthora* e *Pythium* por extrato aquoso de cama de frango (CF) e esterco de suíno (ES), respectivamente, com suas respectivas linhas de tendência.

Os compostos orgânicos voláteis liberados com a decomposição da matéria orgânica também são considerados importantes na indução da supressividade (LAZAROVITS et al., 2006). Os compostos mais eficazes na eliminação de fitopatógenos presentes no solo têm em comum nitrogênio orgânico em sua composição (BELL et al, 1998). A adição de chorume de suíno no solo resulta no aumento das populações microbianas e em particular *Trichoderma* spp. (CONN & LAZAROVITS, 1999). De acordo com Lazarovits et al. (2005), o chorume de suíno tem alta concentração de ácidos graxos voláteis (AGVs). Os AGVs, ácido nítrico e amônia, derivados da decomposição do chorume de suíno, podem reduzir as populações de patógenos em longo prazo (CONN & LAZAROVITS, 1999). Ringer et al. (1997) observaram que após a autoclavagem

o composto a base de resíduos de aves de corte tornou-se mais supressivo a *Rhizoctonia solani* do que todos os outros compostos testados. Este fato se deve a maior concentração de  $\text{NH}_4$  na mistura.

A caracterização química dos materiais orgânicos e biofertilizantes é apresentada nas Tabelas 1 e 2 respectivamente. O FOLC apresentou quantidades superiores de nitrogênio, cálcio, magnésio, enxofre, zinco e soma NPK. O ES obteve maiores quantidades de fósforo total, manganês e cobre. Já a CF, foi superior nos atributos potássio, boro, matéria orgânica, carbono total e pH. O HM foi superior apenas para o ferro e teor de umidade (Tabela 1). Com relação a análise química dos biofertilizantes, o Biof A obteve quantidades superiores dos micronutrientes manganês, cobre e zinco, matéria orgânica, carbono total e teor de umidade. Já o Biof J apresentou maiores quantidades de nitrogênio, magnésio, ferro, soma NPK, pH e condutividade elétrica (Tabela 2). Essas características influenciam na inibição dos patógenos e na atividade de microrganismos antagonistas envolvidos em mecanismos de controle biológico (PEREIRA et al., 1996).

O biofertilizante J proporcionou menor inibição do crescimento micelial dos patógenos. Em todas as concentrações o biofertilizante J estimulou o crescimento micelial de *Phytophthora* spp. e *Fusarium* spp. e não proporcionou efeito inibitório sobre o *Pythium* spp. (Figura 14). O biofertilizante J proporcionou 25% de inibição do crescimento micelial de *Sclerotium* spp. na concentração de 20% (Figura 14). Apesar da menor inibição, em todas as concentrações o biofertilizante J inibiu o crescimento de *Sclerotium* spp.

O biofertilizante A na concentração de 50% inibiu o crescimento micelial de *Phytophthora* spp. em 15%. A inibição do crescimento micelial de *Fusarium* spp. com esse biofertilizante foi de 4% na concentração de 10%, sendo que as demais concentrações estimularam o crescimento do patógeno. O biofertilizante A também não inibiu o crescimento micelial de *Pythium* spp. e a inibição do crescimento de *Sclerotium* spp. foi de 9% na concentração de 40% (Figura 14). Em um trabalho semelhante, Tratch e Bettiol (1996) verificaram que um biofertilizante produzido anaerobicamente em concentrações maiores ou iguais a 10% inibiu totalmente o crescimento micelial de *Pythium*

*aphanidermatum*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Stemphylium solani* e *Rhizoctonia solani*.

Os extratos aquosos de matéria orgânica foram mais eficientes na inibição do crescimento micelial de fitopatógenos do que os biofertilizantes. A Figura 15 mostra as diferenças entre o crescimento micelial dos patógenos para cada material orgânico utilizado. Os resultados relativos às diferentes doses não foram apresentados por não haver efeito de dose entre os materiais orgânicos e biofertilizantes avaliados, exceto para o crescimento micelial de *Pythium* com o esterco de suíno, nas doses 0, 10, 20 e 30%.

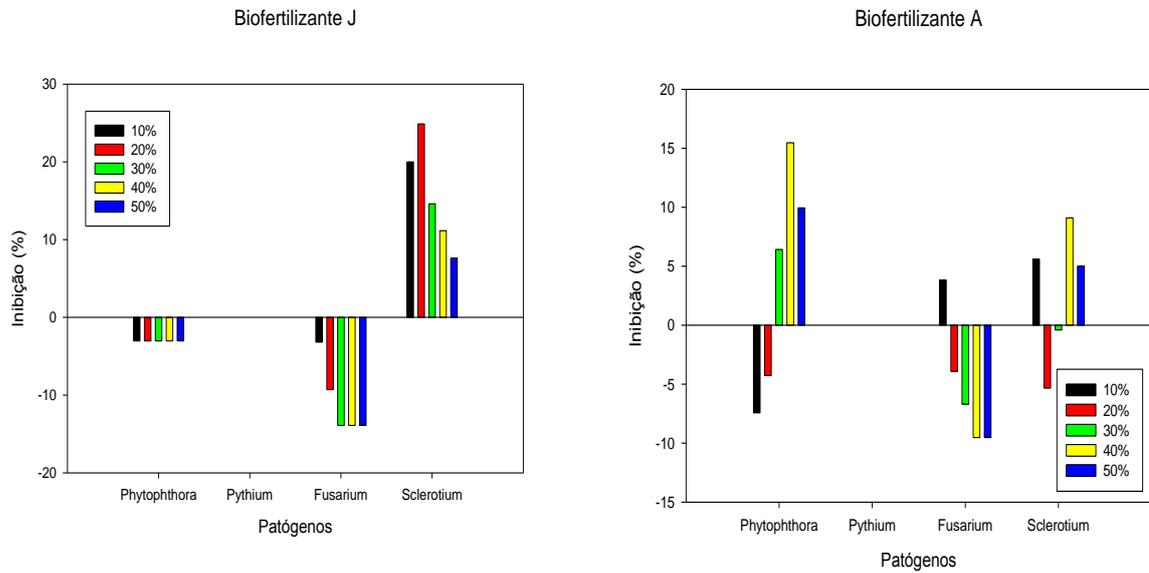
Com relação ao crescimento micelial de *Fusarium* e *Phytophthora*, o húmus de minhoca e o produto à base de farinha de osso e levedo de cerveja (FOLC) não apresentaram diferença entre si, assim como o esterco de suíno e a cama de frango. Porém, o húmus de minhoca e o FOLC diferenciaram-se do esterco de suíno e da cama de frango. Para *Sclerotium* não houve diferença entre a cama de frango e o húmus de minhoca e o FOLC e entre este último e o esterco de suíno. Com relação ao *Pythium*, os únicos que não apresentaram diferença entre si foram a cama de frango e o FOLC (Figura 15a). Os biofertilizantes A e J apresentaram diferença apenas para o crescimento micelial de *Phytophthora* (Figura 15b).

**Tabela 1.** Atributos químicos dos materiais orgânicos utilizados nos estudos. ES = Esterco de suíno; CF = Cama de frango; FOLC = Farelo de osso e levedo de cerveja e HM = Húmus de minhoca.

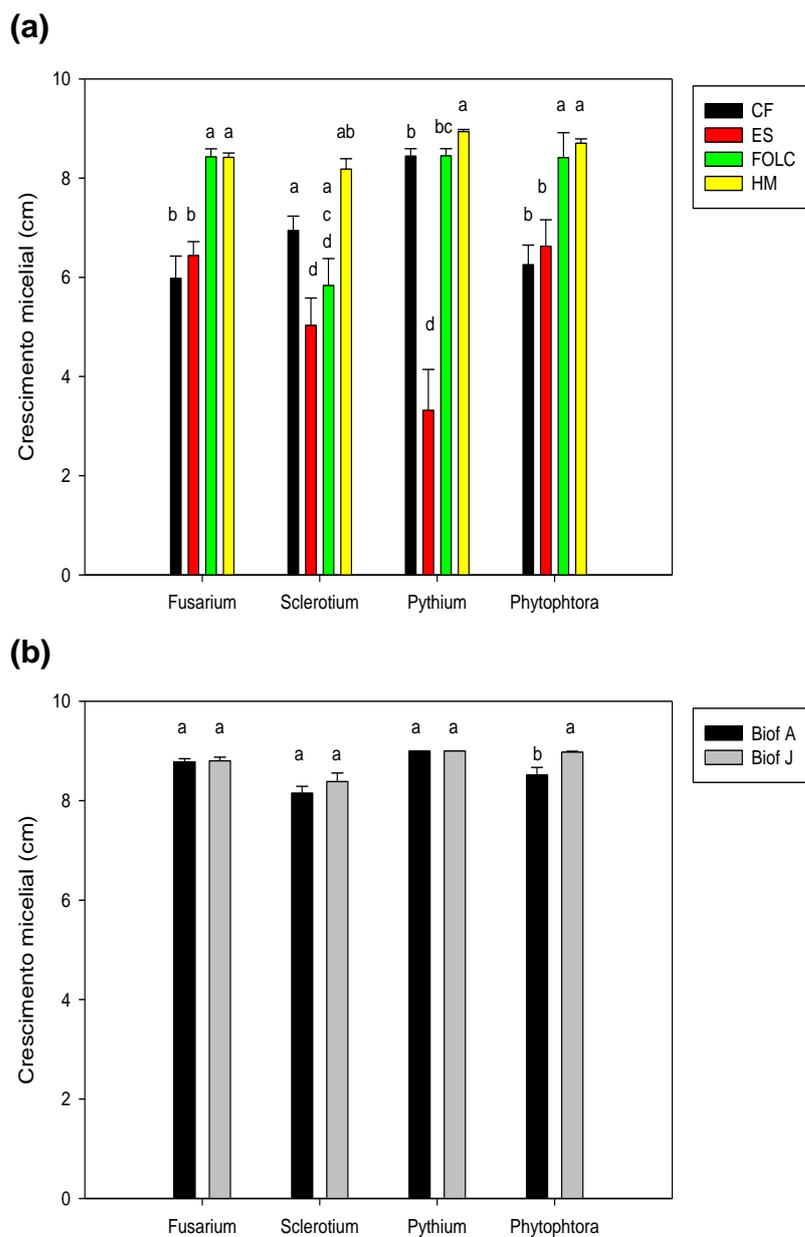
Atributos	Análise	Unidade	ES	CF	FOLC	HM
Nitrogênio	N	%	2,2	3,6	7,5	2,0
Fósforo total	Pt	%	10,2	2,6	5,7	1,1
Potássio	K <sub>2</sub> O	%	1,0	2,3	0,9	0,7
Cálcio	Ca	%	5,2	2,8	6,4	1,6
Magnésio	Mg	%	1,7	0,5	1,9	0,7
Enxofre	S	%	0,2	0,5	2,6	0,2
Ferro	Fe	mg / kg	5260,0	1697,5	1437,5	17000,0
Manganês	Mn	mg / kg	942,5	270,0	645,0	902,5
Cobre	Cu	mg / kg	250,7	168,5	149,0	57,5
Zinco	Zn	mg / kg	946,5	420,8	1489,3	214,8
Boro	B	%	0,010	0,030	0,010	0,010
Umidade	U%	%	25,7	17,4	5,6	53,4
Matéria Orgânica	MO	%	47,8	87,3	68,3	43,3
Carbono Total	C	%	26,5	48,5	38,0	24,1
Soma NPK	NPK	%	13,4	8,5	14,0	3,9
pH	*		7,0	8,2	6,5	7,2
Condutividade Elétrica	CE	mS/m	-	-	-	-
Sódio	Na	%	0,3	0,4	0,4	0,2

**Tabela 2.** Atributos químicos dos biofertilizantes J e A utilizados nos estudos.

<b>Atributos</b>	<b>Análise</b>	<b>Unidade</b>	<b>Biof J</b>	<b>Biof A</b>
Nitrogênio	N	%	0,7	0,1
Fósforo total	Pt	%	0,1	0,1
Potássio	K <sub>2</sub> O	%	0,1	0,1
Cálcio	Ca	%	0,2	0,2
Magnésio	Mg	%	0,1	0,1
Enxofre	S	%	0,1	0,0
Ferro	Fe	mg / kg	402,5	122,5
Manganês	Mn	mg / kg	7,5	17,5
Cobre	Cu	mg / kg	15,0	67,5
Zinco	Zn	mg / kg	30,0	32,5
Boro	B	%	0,010	0,010
Umidade	U%	%	99,6	99,7
Matéria Orgânica	MO	%	74,0	81,7
Carbono Total	C	%	41,1	45,4
Soma NPK	NPK	%	0,9	0,3
pH	*		4,9	4,1
Condutividade Elétrica	CE	mS/m	1,1	0,8
Sódio	Na	%	0,1	0,1



**Figura 14.** Inibição do crescimento micelial de *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* e *Sclerotium* pelos biofertilizantes J e A.

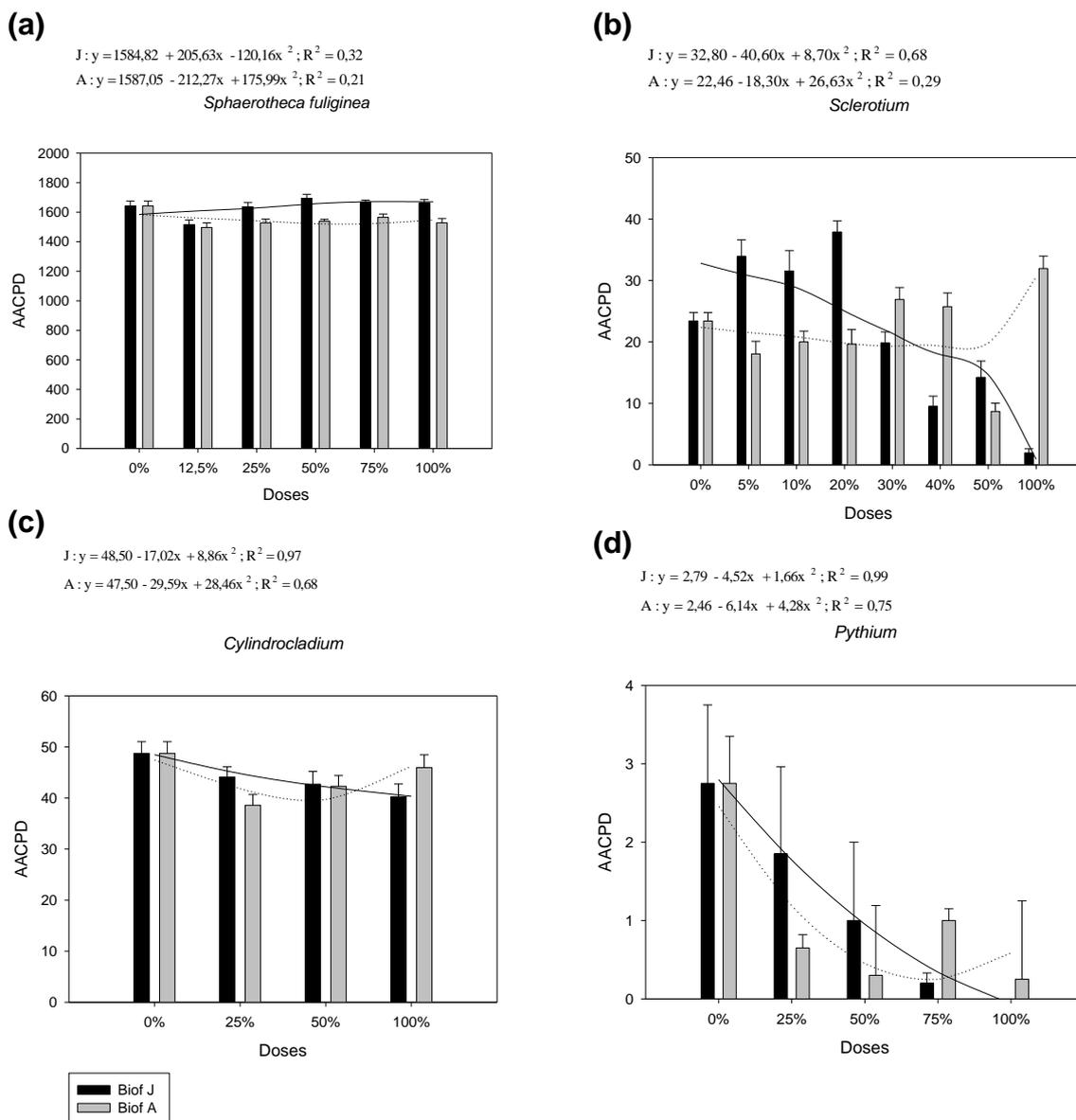


**Figura 15.** Efeito de cama de frango (CF), esterco de suíno (ES), farelo de osso e levedo de cerveja (FOLC) e húmus de minhoca (HM) (a) e aos biofertilizantes Biof A e Biof J (b) no crescimento micelial de *Fusarium*, *Sclerotium*, *Pythium* e *Phytophthora*. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

#### 4.7 Efeito do biofertilizante no controle de doenças de plantas

Com o aumento da concentração de biofertilizante houve uma tendência de redução da área da curva de progresso da doença causada por *Pythium* para os dois biofertilizantes (Figura 16d). Para *Cylindrocladium* essa redução foi baixa para o Biof J e não ocorreu para o Biof A (Figura 16c). Os biofertilizantes não controlaram o oídio causado por *Sphaerotheca fuliginea* em abobrinha (Figura 16a). Para o *Spathiphyllum* o biofertilizante J apresentou redução da doença causada por *Cylindrocladium spathiphylli* com o aumento da concentração, mas a redução foi baixa (Figura 16c).

Segundo Bettioli *et al.* (1998), os biofertilizantes apresentam potencial para o controle de doenças de plantas e podem agir por meio de antibiose (pela presença de antibióticos em sua composição); competição (presença da comunidade microbiana); indução de resistência (tanto microbiana como pelos compostos químicos presentes) e ação direta ou indireta do fornecimento de nutrientes às plantas. Kupper *et al.* (2005) verificaram que o uso de biofertilizante foi efetivo no controle de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citrus. Bettioli (1996) verificou que em concentrações acima de 10% com pulverizações a cada dois dias houve controle do oídio em abóboras e quanto menor o período entre as aplicações, mais efetivo o controle. Os resultados do presente estudo indicam que o efeito dos biofertilizantes sobre as doenças de plantas depende do biofertilizante e do patossistema.



**Figura 16.** Efeito de biofertilizantes sobre a área abaixo da curva de progresso das doenças causadas por *Sphaerotheca fuliginea* (a), *Sclerotium* (b), *Cylindrocladium* (c) e *Pythium* (d) e suas respectivas linhas de tendência.

#### 4.8 Promoção de crescimento com biofertilizante na cultura do feijoeiro

Com relação a aplicação dos biofertilizantes A e J incorporados ao solo, houve diferença significativa para altura, tamanho de internódio (TI), área foliar (AF), peso fresco da parte aérea (PFA) e raiz (PFR) na presença ou ausência de adubação com NPK para os dois biofertilizantes, exceto para o biofertilizante J com relação ao tamanho de internódio (TI), em que não houve diferença na adubação com e sem NPK (Tabela 3). Houve diferença entre os biofertilizantes

A e J na presença de NPK para altura, TI, PFA e PFR, sendo que o biofertilizante A foi superior ao biofertilizante J, exceto para PFA na presença ou ausência de NPK (Tabela 3). Os pesos secos da parte aérea (PSA) e da raiz (PSR) não apresentaram diferenças entre os biofertilizantes e na presença ou ausência de adubação com NPK (dados não apresentados). Os dados para cada concentração não foram apresentados por não haver efeito de dose para os biofertilizantes tanto na presença como na ausência de adubação. Os resultados apresentados a baixo referem-se às duas plantas mantidas para completar o ciclo.

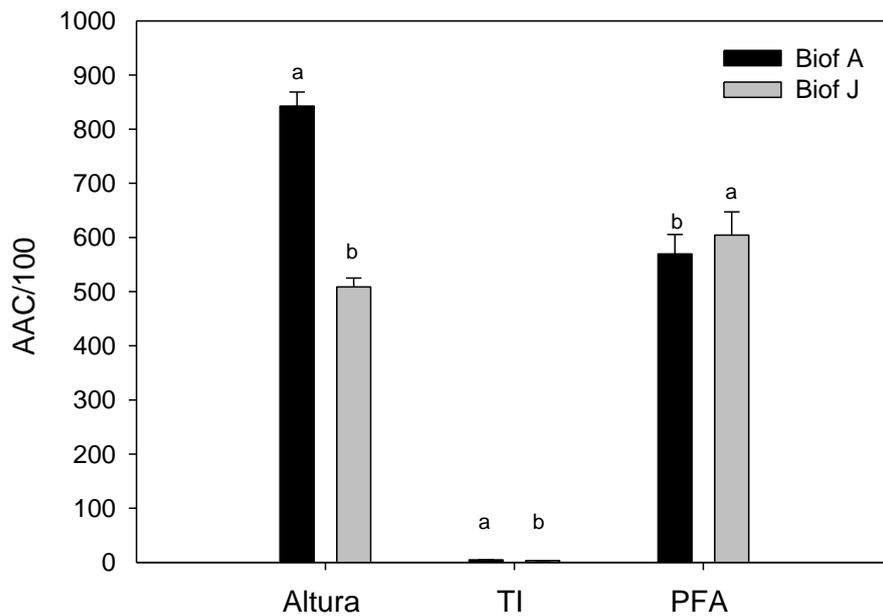
**Tabela 3.** Área abaixo da curva para altura, tamanho de internódio (TI), área foliar (AF), peso fresco da parte aérea (PFA) e peso fresco da raiz (PFR), para cada biofertilizante na presença e ausência de adubação com NPK. A e J = biofertilizantes A e J, respectivamente; (+) e (-) = presença e ausência, respectivamente; NPK = adubação com NPK de acordo com a recomendação para a cultura.

BIOFERTILIZANTE	Altura (cm)		TI (cm)		AF (cm <sup>2</sup> )		PFA (g)		PFR (g)	
	+NPK	-NPK	+NPK	-NPK	+NPK	-NPK	+NPK	-NPK	+NPK	-NPK
A	798,0 aA <sup>1</sup>	288,6 bA	4,6 aA	3,5 bA	59,9 aA	18,4 bA	64,7 aB	7,4 bB	123,3 aA	18,2 bA
J	647,9 aB	276,8 bA	3,4 aB	3,3 aA	61,1 aA	22,1 bA	72,3 aA	18,9 bA	86,3 aB	24,4 bA

<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra não diferenciam entre si (Tukey 5%)

Com relação ao número de nódulos (NN) houve diferença entre os biofertilizantes A e J e presença de NPK (dados não apresentados).

No segundo experimento, onde os biofertilizantes foram aplicados na parte aérea da planta houve diferença entre os biofertilizantes para altura, TI e PFA. Nesse caso, todas as plantas receberam adubação com NPK recomendado de acordo para a cultura (Figura 17). O PFR, PSA, PSR, AF e NN não apresentaram diferença entre os biofertilizantes (dados não apresentados). O biofertilizante A foi superior ao biofertilizante J para a altura e TI (Figura 17). Assim como o primeiro experimento, não houve efeito de dose para os biofertilizantes.



**Figura 17.** Efeito dos biofertilizantes A e J, pulverizados nas folhas, sobre a área abaixo da curva de altura, tamanho de internódio (TI) e peso fresco da parte aérea (PFA) do feijoeiro. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si (Tukey 5%).

Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que os biofertilizantes na ausência de adubação com NPK não promoveram o crescimento das plantas. De acordo com Dessai e Subbiah (1951), citados por Santos e Akiba (1996), os adubos orgânicos por serem fontes de cargas negativas retêm Ca, Mg e K, aumentando, dessa forma, a eficiência da aplicação de fertilizantes e a disponibilidade de nutrientes no solo. Em alguns casos o biofertilizante A, na presença de NPK, foi melhor que o biofertilizante J na presença de NPK. A composição do biofertilizante depende do material pelo qual foi obtido e varia conforme o método de preparo. De modo geral, os biofertilizantes apresentam elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas. Os biofertilizantes podem ser introduzidos nos agroecossistemas por meio de pulverizações foliares, fertiirrigação ou aplicados diretamente ao solo.

De acordo com Santos (1992), o biofertilizante produzido a partir da fermentação anaeróbia de esterco de vaca, quando aplicado via foliar apresenta efeitos nutricionais consideráveis, inclusive aumento da área foliar

em diversas culturas. Segundo Santos e Akiba (1996), quando aplicado em pré-plantio, são necessárias quantidades maiores de biofertilizante nos primeiros anos, mas essa quantidade diminui pela metade nos anos subsequentes. O material orgânico compostado fornece aos solos nutrientes, hormônios, aminoácidos e outras substâncias provenientes de sua decomposição, além de melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo. A utilização de compostos orgânicos na agricultura como fonte de nutrientes para as plantas e para a comunidade microbiana do solo, contribui para a reciclagem de resíduos e redução do uso de fertilizantes sintéticos não-renováveis (THERMORSHUIZEN et al., 2006).

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir:

1. A população de bactérias totais, *Bacillus*, leveduras e fungos em plantas de lírio conduzidas no sistema convencional com alto uso de agrotóxicos é reduzida. Por outro lado, a população é elevada nas plantas conduzidas no sistema sem uso de agrotóxicos.
2. *Sporidiobolus pararoseus* apresenta potencial na redução da incidência e severidade de *Botrytis cinérea*, sendo fundamental manter elevada a sua população para atuar no controle biológico natural da doença.
3. Os biofertilizantes, assim como os materiais orgânicos utilizados na sua produção, possuem potencial no controle de fitopatógenos do solo. Dos materiais avaliados, o esterco de suíno apresentou maior eficácia na redução do crescimento micelial de *Pythium*, chegando a inibir completamente seu crescimento.
4. Os biofertilizantes, na ausência de adubação com NPK, não promoveram o crescimento da planta. Por outro lado, promoveram na presença de NPK.
5. Os biofertilizantes não controlaram o oídio, causado por *Sphaerotheca fuliginea*, em abobrinha, indicando que o efeito dos biofertilizantes sobre as doenças de plantas depende do material orgânico e do patossistema.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, T. W.; Quayyum, A. H.; Burpee, L. L.; Buck, J. W. **Effect of foliar disease on the epiphytic yeast communities of creeping bentgrass and tall fescue.** Can. J. Microbiol., 50: 853 – 860, 2004.

Axelrod, B.; Cheesbrough, T.M. & Laakso, S. **Lipoxygenase from soybean.** Methods Enzymology, 71, 441-451, 1981.

Bai, F.; Zhao, J.; Takashima, M.; Jia, J.; Boekhout, T.; Nakase, T. **Reclassification of the *Sporobolomyces roseus* and *Sporidiobolus pararoseus* complexes, with the description of *Sporobolomyces phafii* sp. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, v.52, 2309 - 2314.

Bell, A. A.; Hubbard, J. C.; Liu, L.; Davis, M. R.; Subbarao, K. V. Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of fusarium yellows of celery. **Plant Disease**, v. 82, pp. 322-328, 1998.

Bettiol, W. **Isolamento seletivo de *Bacillus*.** In: Melo, I. S. & Sanhueza, R. M. V. **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos: Manual técnico.** Jaguariúna, Embrapa – CNPMA, p. 35-36, 1995.

Bettiol, W.; Ghini, R.; Mariano, R. R. L.; Michereff, S. J.; Mattos, P. V. L.; Alvarado, I. C. M.; Pinto, Z. V. Supressividade a fitopatógenos habitantes do solo. In: Bettiol, W.; Morandi, M. A. B. (Org.) **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas.** Cap. 12, pp. 187-208, 2009

Bettiol, W.; Ghini, R. Solos supressivos. In: Michereff, S. J.; Andrade, D.E.G.T.; Menezes, M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: UFRPE, 2005. p. 125-152.

Bettiol, W.; Tratch, R.; Galvão, J. A. H. **Controle de doenças de plantas com biofertilizantes**, Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 22p, 1998.

Bettiol, W. Productos alternativos para el control del oidio (*Sphaerotheca fuliginea*) de la calabaza. In: **Congreso Nacional de la Sociedad Española de Fitopatología**, 8, 1996, Córdoba. Anais... Córdoba, 1996. p.232.

Bettiol, W. Controle biológico de doenças do filoplano. In: BETTIOL, W. (Org.). **Controle Biológico de Doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1991, cap. 4, pp. 33-52.

Boekhout, T.; Nakase, T. *Sporobolomyces* Kluyver & van Niel. In: **The Yeasts, a Taxonomic Study** (Fourth Edition), 1998, p. 828 – 843. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.

Buck, J. W. In vitro antagonism of *Botrytis cinerea* by phylloplane yeasts. **Can. J. Bot.**, 2002, v. 80, pp 885-891

Buck, J. W.; Andrews, J. H. Role of adhesion in the colonization of barley leaves by the yeast *Rhodosporidium toruloides*. **Can. J. Microbiol.** v. 45, pp. 433–440, 1999.

Camatti-Sartori, V.; Ribeiro, R.T.S.; Valdebenito-Sanhueza, R.M.; Echeverrigaray, S.; Pellizari, D.; Silva, E.M.; Boldo, E.L.; Silva, S.; Grazzelli, R.; Becker, R.; Pinto, R.; Azevedo, J.L. Monitoramento de fungos epifíticos nos sistemas de produção orgânico, integrado e convencional da macieira. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 1, p. 721-724, 2006.

Campanhola, C.; Bettiol, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 279p, 2003.

Castoria, R.; De Curtis, F.; Lima, G.; De Cicco, V.  $\beta$ -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. **Postharvest Biology and Technology** v.12, pp. 293–300, 1997

Conn, K. L.; Lazarovits, G. Impact of animal manures on verticillium wilt, potato scab, and soil microbial populations. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 21, pp. 81-92, 1999.

Cook, R. J.; Baker, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Saint Paul: **APS Press**, 1983. p. 254

Costa, M. B. B.; Campanhola, C. **Agricultura alternativa no estado de São Paulo**. Jaguariúna: Embrapa. CNPMA, 1997, 63p.

Dissanayake, N.; Hoy, J. W. Organic material soil amendment effects on root rot and sugarcane growth and characterization of the materials. **Plant Dis.**, 1999, v.83, pp.1039-1046.

Dowding, P.; Peacock, J. **The Use of Leaf Surface inhabiting Yeasts as Monitors of Air Pollution by Sulphur Dioxide**. 1991

Dowding, P.; Richardson, D. H. S. Leafyeasts as Indicator of Air Quality in Europe. **Environmental Pollution**, 1990, v.66, 223-235.

Droby, S.; Wisniewski, M.; El-Ghaouth, A.; Wilson, C. Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Current Achievements and Future Challenges. Proc. XXVI IHC – **Issues and Advances in Postharvest Hort**. Ed. R.K. Prange Acta Hort. 628, ISHS 2003.

Droby S.; Chalutz, E. Mode of action of biocontrol agents of postharvest diseases. In: **Biological Control of Postharvest Diseases—Theory and Practice** (Wilson CL and ME Wisniewski, eds), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994, pp 63–75.

Elad, Y.; Shtienberg, D. Effect of compost water extracts on grey mould (Botrytis cinerea). **Crop Protection**, v.13, n. 2, pp. 109-112, 1994.

El-Ghaouth, A.; Wilson, C.L.; Wisniewski, M. Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology**, v. 93, p. 344-348, 2003.

Fell, J. W.; Tallman, A. S. Heterothallism in the Basidiomycetous Yeast Genus *Sporidiobolus* Nyland. **Current Microbiology**, 1981, v.5, pp. 77 – 82.

Fialho, M. B. **Efeito *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Guinardia citricarpa*, agente causal da pinta preta dos citros**. Piracicaba: ESALQ, 2004. Dissertação de Mestrado.

Fokkema, N. J.; Van de Laar, J. A. J.; Nelis Blomberg, A. L.; Schippers, B. The buffering capacity of the natural mycoflora of rye leaves to infection by *Cochliobolus sativus*, and its susceptibility of benomyl. **Neth. J. Pl. Path.** v.81, pp. 176-186, 1975.

Fokkema N. J.; Den Houter, J. G.; Kosterman, Y. J. C.; Nelis, A. L. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. **Trans. Br. mycol. Soc.**, v.72 (1), pp. 19-29, 1979.

Garcia, F. A. O. **Biocaracterização de procariotas residentes de filoplano de feijoeiro previamente selecionados como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotores de crescimento da cultura**. Viçosa: UFV, 2008. Tese de Doutorado.

Ghini, R. **Mudanças climáticas globais e doenças de plantas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 104p.

Gildemacher, P. R.; Heijne, B.; Houbraken, J.; Vromans, T.; Hoekstra, E. S.; Boekhout, T. Can phyllosphere yeasts explain the effect of scab fungicides on russetting of Elstar apples? **European Journal of Plant Pathology** 110: 929–937, 2004.

Gildemacher, P.; Heijne, B.; Silvestri, M.; Houbraken, J.; Hoekstra, E.; Theelen, B.; Boekhout, T. Interactions Between Yeasts, Fungicides and Apple Fruit Russetting. **FEMS Yeasts Res**, 2006, v.6, 1149 – 1156.

Gross, Y.; Kenneth, R. The fate of carboxin, benomyl and thiabendazole in seed- and soil- treated plants, as shown by *in vitro* and *in vivo* bioassays on some epiphytic yeasts. **Ann. appl. Biol.**, v. 73, 307-318, 1972

Hayashida, S. H.; Choi, M. Y.; Nanri, N.; Yokoyama, M.; Uematsu, T. Control of potato common scab with an antibiotic biofertilizer produced from swine feces

containing *Streptomyces albidoflavus* CH-33. **Agricultural, Biological and Chemistry**, Tokyo, v.53, n.2, p.349-354, Feb.1989.

Hammerschmidt, R.; Nuckles, E.; Kuc, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiology Plant Pathology**, v. 20, p.73-80, 1982.

Heath, M. C. Thoughts on the role and Evolution of induced resistance in natural ecosystems and its relationships to other types of plant defense against disease. In: Hammerschmidt, R.; Kuc, J. (Eds), **Induced Resistance to Disease in Plants**. Kluwer Academic Publishers, pp. 141-151, 1995.

Heil, M. Ecological costs of induced resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, 2002

Herbert, R. A. Methods for enumerating microorganisms and determining biomass in natural environments. In: Grigorova, R., Norris, J. R. (Eds.), **Methods in Microbiology**. Techniques in Microbial Ecology. Academic Press, London, pp. 1-39, 1990.

Hoitink, H.A.J.; Stone, A.G.; Han, D.Y. Suppression of plant diseases by composts. **Hort Science**, Alexandria, v. 32, n. 2, p. 184-187, 1997.

Hoitink, H. A. J.; Fahy, P. C. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. **Annual Review of Phytopathology**, 1986, v. 24 pp. 93-114.

Hoitink, H. A. J.; Boehm, M. J. Biocontrol within the context of soil microbial communities: A substrate-dependent phenomenon. **Annual Review of Phytopathology**, 1999, v. 37, pp. 427- 446.

Jacques, M.; Morris, C. E. A Review of Issues Related to the Quantification of Bacteria from the Phyllosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, 1995, v.18, 1-14.

Janderová, B.; Gásková, D.; Bendová, O. Consequences of *Sporidiobolus pararoseus* Killer Toxin Action on Sensitive Cells. **Folia Microbiol.** 1995, 40 (2), 165-167.

Janisiewicz, W.J.; Tworkoski, T.J.; Sharer, C. Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. **Phytopathology**, v. 90, p. 1196 - 1200, 2000.

Kupper, K. C.; Bettiol, W.; Góes, A.; Souza P. S.; Bellote, J. A. M. Biofertilizer for control of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus blac spot, **Crop Protection**, n. 25, p. 569-573, 2006.

Last, F. T.; Deighton, F. C. The Non-Parasitic Microflora on the Surfaces of Living Leaves. **Trans. Brit. Mycol. Soc.**, 1965, 48(1), 83-99.

Lazarovits, G.; Conn, K.L.; Abbasi, P.A. Understanding the mode of action of organic soil amendments provides the way for improved management of soilborne plant pathogens. In: Vanachter, A. (Ed.). **Proceedings of the Sixth International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Desinfestation**, p. 215-222, 2005.

Lazarovits G.; Abbasi, P.; Conn, K. Managing soil agro-ecosystems for environmental and plant health: back to the future. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v.32, supl., pp.153-157, 2006.

Lever, M. A New Reaction for Colorimetric Determination of Carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p.273-279, 1972.

Louvet, J. The relationships between substrates and plant diseases. **Acta Horticulturae**, Amsterdam, v.126, pp. 147-152, 1986.

Lumsden, R. D.; Lewis J. A.; Millner, P. D. Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. **Disease Control and Pest Management**, 1983, v.73, n.11, pp 1543-1548.

**MAPA** - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto no 4.954, de 14/1/2004. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=5473>

Marengo, J. A. Mudanças climáticas globais e regionais: avaliação do clima atual do Brasil e projeções de cenários climáticos futuros. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 16, p.1-18, 2001.

McQuilken, M. P.; Whipps, J. M.; Litch, J. M. Effects of water extracts of a composted manure-straw mixture on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 10, n.1, p.20-26, 1994.

Medeiros, A.O.; Kohler, L.M.; Hamdan, J.S.; Missagia, B.S.; Barbosa, F.A.R.; Rosa, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v.42, p.3921-3929, 2008.

Medeiros, M. B.; Wanderley, P. A.; Franklin, F.; Fernandes, F. S.; Alves, G. R.; Dantas, P.; Cordão, R. P.; Xavier, W. M. R.; Neto, J. S. L. **Uso de biofertilizantes líquidos no manejo ecológico de pragas agrícolas**. Disponível em: <[www.proc.ufpb.br/meae/anais%2011%20Encontro%20Tem%20E1tico/trabalhos/BIOFERTILIZANTES.doc](http://www.proc.ufpb.br/meae/anais%2011%20Encontro%20Tem%20E1tico/trabalhos/BIOFERTILIZANTES.doc)> Acesso em: 24/01/2007.

Medeiros, M. B.; **Ação de biofertilizantes líquidos sobre a bioecologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis***. Piracicaba, 2002, 110p:il.

Moraes, W. B. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 1992, v.27, pp. 175 -190.

Morandi, M. A. B.; Junior, T. J. P.; Bettiol, W.; Teixeira, H. Controle biológico de fungos fitopatogênicos. **Informe agropecuário**. v. 30, n. 251, pp. 73-82, 2009.

Morandi, M. A. B. ; Mattos, L. P. V. De ; Santos, E. R. Dos ; Bonugli, R. C. Influence of application time on the establishment, survival, and ability of *Clonostachys rosea* to suppress *Botrytis cinerea* sporulation on rose debris. **Crop Protection**, v. 27, p. 77-83, 2007.

Morandi, M. A. B.; Maffia L. A.; Mizubuti, E. S. G.; Alfenas, A. C.; Barbosa, J. G. Suppression of *Botrytis cinerea* sporulation by *Clonostachys rosea* on rose debris: a valuable component in *Botrytis* blight management in commercial greenhouses. **Biological Control**, v.26, pp. 311-116, 2003.

Morandi, M.A.B., Sutton, J.C., MaFFla, L.A. Effects of host and microbial factors on development of *Clonostachys rosea* and control of *Botrytis cinerea* in rose. **Eur. J. Plant Pathol.** 106, 439–448, 2000.

Nakasone, A. K. **Possibilidade de controle de fitopatógenos com extratos aquosos de matéria orgânica**. Lavras: UFLA, 1998. Dissertação de Mestrado.

Nelson, E. B.; Hoitink, H. A. J. The role of microorganisms in the suppression of rhizoctonia solani in container media amended with composted hardwood bark. **Phytopathology**, v. 73, pp. 274-278, 1983.

Pascholati, S.F.; Nicholson, R.L. & Butler, L.G. Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. **Journal of Phytopathology**, v. 115 (2), p. 165-172, 1986.

Patrício, F. R. A. Controle de doenças de hortaliças- convencional VS alternativo. **Biológico**, São Paulo, v. 69 n. 2 pp. 87-90, 2007.

Pereira, J.C.R.; Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Chaves, G.M. Compostos orgânicos no controle de doenças de plantas. **RAPP**, v.4, pp. 353-379, 1996

Pinheiro, S.; Barreto, S. B. **“MB-4”: Agricultura Sustentável, Trofobiose e Biofertilizantes** - Edição especial V Fórum Social Mundial. Fundação Juquira Candiru-Mibasa, 2005, 275p.

Pinto, Z. V. **Desenvolvimento de substrato supressivo à murcha do crisântemo causada por Fusarium oxysporum**. Botucatu: FCA Unesp, 2008. Tese de Doutorado.

Pupo, M. T.; Gallo, M. B. C.; Vieira, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 6, pp. 1446 - 1455, 2007.

Ringer C. E. Suppression of seedling damping-off disease in potting mix containing animal manure composts. **Compost Science and Utilization**, v.5, n.2, 1997.

Romeiro, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas - Fundamentos**. Viçosa: Ed. Ufv, P. 269, 2007.

Romeiro, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas - Procedimentos**. Viçosa: Ed. UFV, 172 p, 2007.

Santos, A. C. V. **Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza**. Niterói: Emater – Rio, 1992. 16p (Agropecuária Fluminense).

Santos, A. C. V.; Akiba, F. **Biofertilizante líquido: uso correto na agricultura alternativa**. Colab. Araújo, J. S. P. Seropédica: UFRRJ, Impr. Univ., 1996.

Segarra, G.; Casanova, E.; Borrero, C.; Avilés, M.; Trillas, I. The suppressive effects of composts used as growth media against *Botrytis cinerea* in cucumber plants. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, pp. 393-402, 2007.

Seixas, J.; Folk, S.; Machetti, D. Construção e funcionamento de biodigestores. Brasília: Embrapa - CPAC, 60 p. 1980. **Circular técnica**

Sharma, R. N.; Maharshi, R. P.; Gaur, R. B. *Sporidiobolus pararoseus* Fell & Tallman – an antagonistic yeast with biocontrol potential. **Current Science**, vol. 95, n. 8, 2008, pp. 1003 - 1004.

Statzell-Tallman, A. & Fell, J. W. *Sporidiobolus* Nyland. In **The Yeasts, a Taxonomic Study** (Fourth Edition), 1998, pp. 693 - 699. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier.

Siedow, J. N.; Plant lipoxygenase: structure and function. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** v. 42, pp. 145-188, 1991.

Tratch, R.; Bettiol, W. Efeito de biofertilizantes sobre o crescimento micelial e a germinação de esporos de alguns fungos fitopatogênicos, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.32, n.11, p.1131-1139, 1997.

Texeidó, N.; Usall, J.; Magan, N.; Viñas, I. Microbial population dynamics on Golden Delicious apples from bud to harvest and effect of fungicide applications. **Annual of Applied Biology**, v 134, p 109-116, 1999.

Termorshuizen, A.J.; Van Rijn, E.; Van Der Gaag, D.J.; Alabouvette, C.; Chen, Y.; Lagerlof, J.; Malandrakis, A.A.; Paplomatas, E.J.; Ramert, B.; Ryckeboer, J.; Steinberg, C.; Zmora-Nahum, S. Suppressiveness of 18 composts against 7 pathosystems: Variability in pathogen response. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 38, p. 2461-2477, 2006.

Tuzun, S.; Kloepper, W. J. Potencial application of plant growth-promoting rhizobacteria to induce systemic disease resistance. Reuveni, R. (Ed.) In: **Novel approaches to integrated pest management**. Cap. 6, pp. 115-127, 1995.

Valarini, G. A.; Melo, I. S. **Leveduras como bioindicadores da poluição do ar**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 30p.

Valdebenito-Sanhueza, R. M. Leveduras para o Biocontrole de Fitopatógenos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna, SP: Embrapa Meio Ambiente, 2000, cap. 2, vol. 3, 388p.

Van Bruggen, A. H. C. Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming systems. **Plant Disease**, v. 79, n.10, p. 976-984, 1995.

Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 1998, v.36, pp. 453 – 483.

Vessey, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, 2003, v.255 pp. 571-583.

Visconti, A. **Fontes de matéria orgânica para inibição de fitopatógenos habitantes do solo**. Botucatu: FCA Unesp, 2008. Dissertação de Mestrado.

Weltzien, H. C. (1992) Biocontrol of foliar fungal discascs with compost extracts. In: **Microbial Ecology of Leaves** (Ed. by J. H. Andrews and S. S. Hirano) Springer-Verlag, New York, pp. 430-450, 1992.

Wit, J.P.W.; Kievitsbosh, R.A.; Bettiol,W. Integração de métodos físicos e biológicos para o controle de doenças e pragas em lírio e espatifilo. In: Bettiol, W.; Morandi, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009, p.331-336.

Xue, L.; Charest, P. M.; Jabaji-Hare, S. H. Systemic induction of peroxidases, 1,3-B-glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. **Biological Control**, v. 88, n. 4, pp. 359-365, 1998.