

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA-CA

DIANNY REGINA SILVA BARROS

**MANEJO DA FUSARIOSE DO CAUPI: reação de cultivares e controle biológico
in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* spp.**

SÃO LUÍS-MA

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
CURSO DE ENGENHARIA AGRÔNOMICA-CA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**MANEJO DA FUSARIOSE DO CAUPI: reação de cultivares e controle biológico
in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* spp.**

Monografia apresentada ao Curso de
Agronomia da Universidade Estadual
do Maranhão para a obtenção do título
de Engenheira Agrônoma.

SÃO LUÍS-MA

2019

Barros, Dianny Regina Silva.

MANEJO DE FUSARIOSE DO CAUPI: reação de cultivares e controle biológico *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* ssp. / Dianny Regina Silva Barros. – São Luís, 2019.

... f

Monografia (Graduação) – Curso de Agronomia, Universidade Estadual do Maranhão, 2019.

Orientador: Prof^a. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues.

1.Controle biológico. 2.Murcha de fusarium. 3. *Vigna unguiculata*. I.Título

CDU: 633.33-293.7

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA
CURSO DE ENGENHARIA AGRONÔMICA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**MANEJO DA FUSARIOSE DO CAUPI: reação de cultivares e controle biológico
in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* spp.**

data 5/7/2019

Banca Examinadora

Antônia Alice Costa Rodrigues

Orientadora: Prof. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues

Leonardo de Jesus Machado Góis de Oliveira

Examinador: Msc. Leonardo de Jesus Machado Góis de Oliveira

Mônica Shirley Brasil dos Santos e Silva

Examinadora: Msc. Mônica Shirley Brasil dos Santos e Silva

SÃO LUÍS-MA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais Didiana e Valter que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando a ser alguém melhor.

Aos meus tios Dione e Sebastião que me acolheram como filha, minha eterna gratidão.

Agradeço aos meus dois irmãos Marcus e Valter Jr. que mesmo longe, me apoiaram e me alegraram nos momentos difíceis.

As minhas primas Mirelly e Michelly, pela fiel amizade.

Agradeço aos meus dois amigos que se tornaram irmãos, Abimael Carmo e Alaíde Sobral por todo companheirismo e por todos os momentos que compartilhamos juntos.

À professora, Dra. Antônia Alice pela orientação e suas importantes contribuições prestadas durante a realização deste trabalho.

Ao Msc. Leonardo Góis agradeço por sua amizade, apoio, companheirismo e por toda paciência durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do curso de agronomia, em especial a professora Dra. Gislane Lopes que através dos seus ensinamentos permitiram contribuir na minha carreira profissional.

À toda equipe do Laboratório de Fitopatologia pelo carinho e ajuda prestada nessa caminhada.

Agradeço aos amigos da turma 2014.1 de agronomia e todos que conquistei durante esse percurso, por todos os obstáculos vencidos juntos.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Feijão Caupi (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp).....	14
2.2 Cultivares de feijão caupi	15
2.3 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> agente causal da Murcha de Fusarium.....	16
2.4 Resistência genética e mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos..	17
2.5 Influência da nutrição por esterco bovino e adubo químico NPK no controle de doenças de solo.	18
2.6 Controle biológico de fitopatógenos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Local de estudo	20
3.2 Preparo das Mudas de feijão caupi	20
3.3 Obtenção dos isolados de <i>Bacillus</i> spp. e do isolado de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	21
3.4 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão caupi a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> sob adubação com esterco bovino.	21
3.5 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão caupi a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> sob adubação química.	22
3.6 Análise da severidade da doença	22
3.7 Efeito da produção de metabólitos termoestáveis mediados por <i>Bacillus</i> spp. a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	23
3.8 Avaliação do antagonismo de <i>Bacillus</i> spp a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> <i>in vitro</i> pelo método do pareamento de círculo.	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão caupi ao <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> sob adubação com esterco.....	24
4. 2 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão-caupi a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> sob adubação química.	29
4.3 Efeito da produção de metabólitos termoestáveis mediados por <i>Bacillus</i> spp. a <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>	33

4.4 Avaliação do antagonismo de <i>Bacillus</i> spp a <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> in vitro pelo método do pareamento de círculo	35
5 CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Cultivares de Feijão caupi com sintomas de murcha de *Fusarium* causadas por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, BRS (A – Aracê), (B – Pujante), (C – Guariba), (D – Tumucumaque), E (BR-17 Gurguéia) e F (Manteiguinha).....27
- Figura 2.** Planta com presença de murcha de *Fusarium*, (A) cultivar BR -17 Gurguéia com escurecimentos vasculares e planta (B) cultivar BRS-pujante aparentemente sadia, livre de sintomas da doença.....28
- Figura 3.** Confirmação da presença do fitopatógeno em plantas de caupi, cultivar BR- 17 Gurguéia.....28
- Figura 4.** Cultivares de Feijão caupi com sintomas de murcha de *Fusarium* causadas por fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, BRS (A – Aracê), (B – Guariba), C – Pujante), (D – Tumucumaque), E (BR-17 Gurguéia) e F (Manteiguinha).....31
- Figura 5.** Planta com presença de murcha de *Fusarium*, (A) cultivar BRS-Guariba com escurecimentos vasculares e planta (B) cultivar BRS-Pujante aparentemente sadia, livre de sintomas da doença.....32
- Figura 6.** Placas de Petri contendo colônias do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* reisolado de partes do caule das plantas infestadas confirmando *in vitro* a presença desse fitopatógeno nas cultivares de Caupi (A-B) BRS-Guariba e (B-C) BRS-Guariba.....33
- Figura 7.** Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* spp. por metabolitos termoestáveis. MGSS – 275 (*Bacillus thuringiensis*) Testemunha – (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*).....35
- Figura 8.** Atividade antagônica *in vitro* de *Bacillus* spp. contra fungo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* pelo método do pareamento de círculo.....37

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Isolados de *Bacillus* spp. e do desafiante *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* utilizados no experimento *in vitro*.....21
- Tabela 2.** Reação de cultivares de Feijão caupi ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação com esterco bovino.....25
- Tabela 3.** Reação de cultivares de feijão caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação química.....29
- Tabela 4.** Antagonismo de *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* através de metabólitos termoestáveis.....34
- Tabela 5.** Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* spp. pelo método do pareamento de círculo.....36

RESUMO

A murcha de Fusarium causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, é uma das principais doenças que ocorrem no Feijão caupi. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resistência de cultivares de Feijão caupi a murcha de Fusarium e o efeito inibitório *in vitro* produzido por isolados de *Bacillus* spp. sobre o *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Realizou-se dois testes de resistência com seis cultivares de Caupi: BRS Aracê, BRS Pujante, BRS Guariba, BRS Tumucumaque, BR-17 Gurguéia e Manteiguinha. As cultivares foram adubadas com esterco bovino no primeiro ensaio e adubo químico NPK 15-15-20 no segundo ensaio. As plantas foram inoculadas com o fitopatógeno e avaliadas a reação das cultivares 21 dias após a inoculação pela escala de notas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis cultivares e dez repetições no primeiro experimento e seis cultivares e cinco repetições, no segundo experimento. Para as avaliações de severidade (SVD) as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. A atividade antagonista foi avaliada por dois métodos: metabólitos termoestáveis e pareamento pelo método de círculo. A avaliação do potencial de antagonismo foi realizada ao quarto, quinto e décimo dia medindo-se em dois sentidos diametralmente opostos com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia. Os experimentos constavam de seis tratamentos e cinco repetições. Para os dois métodos avaliados delineamento foi inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. As cultivares BRS Aracê e BRS Pujante apresentaram maior resistência ao fitopatógeno. No segundo experimento constatou-se que as cultivares BR-17 Gurguéia, BRS Tumucumaque e BRS Guariba, apresentaram maior susceptibilidade à murcha de Fusarium. Na avaliação do potencial de metabólitos termoestáveis as espécies de *Bacillus* todos demonstraram antagonismo ao *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, pois todos produziram metabólitos capazes de inibir o crescimento do patógeno. No método de círculo, aos cinco e dez dias constatou-se que todos os tratamentos com o isolado *Bacillus* spp. apresentaram efeito inibidor sobre o crescimento micelial do fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Desta forma, a identificação de variedades resistentes e o controle biológico por microrganismos apresenta-se como alternativa inteligente para redução ou eliminação do uso de agroquímicos no controle de fitopatógeno.

Palavras-Chave: Controle biológico, murcha de Fusarium, *vigna unguiculata*

ABSTRACT

Fusarium wilt caused by the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, is one of the major diseases that occur in cowpea beans. The objective of this work was to evaluate the resistance of Fusarium wilt cowpea cultivars and the in vitro inhibitory effect produced by *Bacillus* spp. on *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Two resistance tests were carried out with six Caupi cultivars: BRS Aracê, BRS Pujante, BRS Guariba, BRS Tumucumaque, BR-17 Gurguéia and Manteiguinha. The cultivars were fertilized with bovine manure in the first assay and NPK 15-15-20 chemical fertilizer in the second assay. The plants were inoculated with the phytopathogen and evaluated the reaction of the cultivars 21 days after inoculation by the grading scale. The experimental delineamento was completely randomized with six cultivars and ten replicates in the first experiment and six cultivars and five replicates in the second experiment. For severity assessments (SVD) the means were compared by the Tukey test at 5% probability. The antagonist activity was evaluated by two methods: thermostable metabolites and pairing by the circle method. The evaluation of the potential of antagonism was performed on the fourth, fifth and tenth days measured in two diametrically opposed directions with the aid of a millimeter ruler, defining an average for each colony. The experiments consisted of six treatments and five replicates. For the two evaluated methods the design was completely randomized and the means were compared by the Tukey test at 5% probability. The cultivars BRS Aracê and BRS Pujante presented greater resistance to the phytopathogen. In the second experiment, the cultivars BR-17 Gurguéia, BRS Tumucumaque and BRS Guariba, showed higher susceptibility to Fusarium wilt. In the evaluation of the potential of thermostable metabolites the *Bacillus* species all showed antagonism to *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, since they all produced metabolites capable of inhibiting the growth of the pathogen. In the circle method, at 5 and 10 days, it was verified that all the treatments with the isolate *Bacillus* spp. showed an inhibitory effect on the mycelial growth of fungus *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. In this way, the identification of resistant varieties and the biological control by microorganisms presents / displays like intelligent alternative for reduction or elimination of the use of agrochemicals in the control of phytopathogen.

Key words: Biological control, Fusarium wilt, *vigna unguiculata*

1 INTRODUÇÃO

O Feijão caupi, feijão de corda ou feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tem grande importância econômica e social para a região Nordeste do Brasil, uma vez que é um dos alimentos básicos das populações de baixa renda dessa localidade (LIMA et al., 2011). O cultivo de Feijão caupi é realizado predominantemente sob o regime de sequeiro em solos de baixa a média fertilidade, com uso, de baixa tecnologia. Outra característica é o seu cultivo em regiões com regime hídrico mal distribuído (BENVINDO et al., 2010).

O Feijão caupi é uma cultura importante para enfrentar as possíveis mudanças climáticas, como o aumento da temperatura e a redução da disponibilidade de água (CARVALHO et al., 2017a). Nesse sentido, variedades tradicionais da espécie que preservam alta variabilidade genética quanto a caracteres de tolerância ou resistência a fatores bióticos e abióticos, podem auxiliar os programas de melhoramento no desenvolvimento de cultivares mais produtivas (CARVALHO et al., 2017b).

Essas variedades também vêm sendo selecionadas pelos agricultores ao longo do tempo, o que contribui para sua evolução, mas essa seleção é muito menos intensa quando comparada à realizada nos programas de melhoramento. A evolução dessas variedades também é influenciada pelos manejos adotados pelos agricultores familiares, o que as torna mais habilitadas a atender suas necessidades (CUNHA et al., 2013).

Os principais cultivos agrícolas no Brasil são afetados por diversas doenças de importância econômica, que podem ser de origem bacteriana, fúngica, viral ou causada por nematóides. Essas doenças levam à diminuição na produção podendo chegar até a perda total da lavoura, causando assim grandes prejuízos econômicos aos produtores. Dentre as doenças mais preocupantes estão aquelas causadas por fungos que atacam desde o início até o final do ciclo da cultura afetando todas as partes da planta (BRAGA JUNIOR et al., 2017).

O feijoeiro é afetado por fungos que habitam o solo, entretanto, os mais importantes são os que causam infecções nas raízes, como *Fusarium solani* (podridão das raízes), no hipocótilo e nas hastes: *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (murcha de fusário), (EMBRAPA, 1990).

A resistência genética destaca-se como uma ferramenta extremamente útil no manejo de doenças causadas por fitopatógenos habitantes do solo. O controle genético desses parasitas deve ter sido praticado inconscientemente pelos primeiros agricultores,

ao selecionarem materiais por vezes mais produtivos por serem menos suscetíveis às doenças radiculares. Contudo, a demonstração que a resistência era uma característica controlada geneticamente só se deu após a redescoberta dos trabalhos de Mendel, no início do século XX. Desde então, grandes avanços ocorreram, estabelecendo o estudo da resistência de plantas a doenças como um importante ramo da Fitopatologia (LIMA; ASSUNÇÃO; VALLE, 2005).

A ocorrência e a severidade da murcha de *Fusarium* têm aumentado, devido, principalmente, à falta de cuidados necessários com os métodos preventivos de controle. Além disso, quase não há estudos sobre as perdas no rendimento, contudo, sabe-se que os danos provocados por esta enfermidade são muito variáveis, podendo afetar apenas algumas plantas ou até 80% da lavoura, isto porque a murcha do fusário inicia-se em pequenas reboleiras e, após alguns anos de cultivo dissemina-se por toda área (SARTORATO et al., 1994).

A grande diversidade de microrganismos, bem como, suas relações antagônicas, é uma alternativa para o controle biológico aplicado a alguns agentes patogênicos (BRAGA JUNIOR et al., 2017). Entretanto, o método mais utilizado para o controle desses fitopatógenos é o químico. Todavia, o intensivo uso de produtos químicos nas últimas décadas vem criando inúmeros problemas, tais como: resistência microbiana, contaminação ambiental (água, solo, produtor e consumidor) e elevação dos custos de produção. Assim torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas de controle desses fitopatógenos. Dentre as alternativas estudadas, atualmente, destaca-se o controle biológico por meio de microrganismos antagonistas (MOREIRA et al., 2008; SILVA et al., 2014).

Neste sentido, o uso de agentes de controle biológico é considerado uma alternativa viável para diminuir o potencial de inóculo de patógenos habitantes do solo. Além disso, não contamina o meio ambiente deixando resíduos e possui fácil aplicação (SOARES et al., 2006). Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência de cultivares de Feijão caupi a murcha de *Fusarium* e o efeito inibitório *in vitro* produzido por isolados de *Bacillus* spp. sobre o *F. oxysporum* f. sp. *thacheiphilum*

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)

O Feijão caupi ou feijão de corda é uma dicotiledônea pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, tribo Phaseoleae e gênero *Vigna*, o qual apresenta ampla distribuição nas zonas tropicais da África, Ásia e Américas, sendo representado por várias espécies (PADULOSI; NG, 1997).

A área total cultivada com essa espécie no país é estimada em 78.837.098 hectares, com uma produção nacional de 2.973.932. Na região Nordeste, o feijão caupi ocupa 11.587.036 hectares total da área plantada e uma produção de 560.118 toneladas, enquanto no Maranhão a área total cultivada foi de 2.014.498 hectares, com uma produção de 35.753 mil toneladas (2 safras) no ano agrícola de 2018/2019 (IBGE, 2019). Sendo uma leguminosa de grande relevância agrônômica e econômica por ser um dos grãos mais consumidos no Brasil, consiste em uma importante fonte de proteína, minerais e fibras. Apresenta aspectos que facilitam seu cultivo, como ciclo curto, resistência a déficit hídrico e adaptação a solos de baixa fertilidade (ZILLI et al., 2009; XAVIER et al., 2012; COSTA et al., 2014).

O Feijão caupi, como a maioria das culturas, não se desenvolve satisfatoriamente em solos mal ou muito mal drenados, devido à permanência do excesso de água no perfil do solo, que proporciona ambiente anaeróbico. Logo, deve-se dar preferência a solos de textura franco-arenosa a franco-argilosa, bem drenados e de relativa fertilidade natural. Áreas anteriormente cultivadas com a cultura e que apresentem incidência de doenças causadas por fungos do solo devem ser evitadas e utilizadas com outra cultura (rotação). Deve-se também dar preferência a terrenos planos ou pouco declivosos, pois o feijão caupi, como a maioria das culturas anuais, contribui bastante para a erosão do solo (FREIRE FILHO et al., 2011).

A cultura é afetada no Brasil e em outras partes do mundo por diversos patógenos, como fungos, bactérias, vírus e nematóides. A ação desses organismos sobre as plantas leva à morte de tecidos, órgãos e até mesmo da planta inteira, causando perdas econômicas consideráveis ao agronegócio do caupi. Diferentemente das pragas, que podem ser detectadas através das posturas antes de ocorrer o prejuízo econômico, as doenças de plantas, quando presentes numa área de cultivo, já representam perda de produção parcial ou total. Dessa forma, o conhecimento prévio das doenças mais importantes da cultura do feijão caupi e a aplicação de medidas de manejo

preventivamente minimizarão as possíveis perdas decorrentes do ataque de patógenos (VALE; BERTINI; BORÉM, 2017).

Além dos fatores supracitados, indispensáveis na escolha de um cultivar, é imprescindível que este apresente resistência a certas doenças e pragas comuns à cultura (VALE; BERTINI; BORÉM, 2017).

2.2 Cultivares de Feijão caupi

O Feijão caupi possui grande variabilidade genética e assim uma grande plasticidade, o que contribuiu para sua ampla utilização. A cultura apresenta grande variabilidade morfológica, com diferentes hábitos de crescimento, formas e coloração de vagens e sementes, dentre outras. No entanto, desde a introdução no país e por muitos anos de cultivo, ocorrem na espécie cruzamentos naturais, seleção natural e seleção pelos próprios produtores quanto a diversos caracteres, o que ocasiona a perda de muitos alelos (FREIRE FILHO et al., 2011).

A cultivar BRS Guariba possui tegumento branco, é resistente a diversas doenças e tem boa adaptabilidade em diferentes ecossistemas do país, sobretudo nas regiões Nordeste, Norte e Centro Oeste, onde vem aumentando sua área de produção principalmente como opção para cultivo em safrinha. A BRS Guariba foi obtida do cruzamento da linhagem IT85F-2687, introduzida do International Institute of Tropical Agriculture-IITA da Nigéria, com a linhagem TE87-98-8G, do Programa de Melhoramento Genético de Feijão caupi da Embrapa Meio-Norte, em Teresina, PI. Embora seja de crescimento indeterminado, a cultivar tem ramos relativamente curtos e apresenta resistência ao acamamento, característica que facilita a colheita, já que as vagens ficam posicionadas acima da folhagem, o que melhora tanto a visualização dessas estruturas, como a colheita propriamente dita (EMBRAPA, 2009a).

A BRS Pujante cultivar do tipo sempre verde, com grãos graúdos e vagens compridas é recomendado para plantio de sequeiro, no primeiro semestre, e irrigado, no segundo semestre (SANTOS, 2011a). A BRS Aracê tem como características marcantes os grãos de cor verde-oliva e vagens de cor roxa e formato levemente reto. Com relação à parte nutricional, tem alto teor de proteína, é rica em ferro e zinco e tem cozimento rápido (EMBRAPA, 2009b).

A cultivar BRS Tumucumaque apresenta porte semiereto, resistência ao acamamento, o que facilita a colheita, e ciclo variando de 70 a 75 dias. Os grãos são brancos, preferidos pela população amazonense, com alto teor de ferro e zinco; e as

vagens, quando secas, são roxas. Apresenta grau moderadamente resistente e resistente às principais doenças da cultura (EMBRAPA, 2014). Já a BR 17-Gurguéia é recomendada para o cultivo no Estado do Piauí, nas microrregiões de Teresina, Médio Parnaíba Piauiense e Bertolínea, em cultivo de sequeiro, e Baixo Parnaíba Piauiense e Alto Médio Gurguéia em cultivo irrigado (EMBRAPA, 1998). Na região Norte, há ainda um tipo de feijão-caupi muito importante para a culinária local chamado de Manteiguinha, tem grãos de cor creme, muito pequenos

2.3 *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* agente causal da Murcha de Fusarium

Fusarium é um gênero heterogêneo com uma distribuição muito ampla que inclui várias espécies já foram descritas desde os árticos até as areias do Sahara. Uma característica comum de *Fusarium* spp. é a produção de macroconídios de forma alatoide (WINDELS 1991; AZEVEDO DIAS; ABREU; RESENDE, 2014). O estágio sexual já foi detectado em algumas espécies de *Fusarium* e características morfológicas e patológicas sobre o gênero são pouco conhecidas e menos ainda se conhece a respeito da espécie *Fusarium oxysporum* (KURAMAE; SOUZA, 2002).

Os conceitos de *formae specialis* e raças, baseadas na patogenicidade, têm sido amplamente usadas somente para subdivisões de *F. oxysporum*, o que tem causado controvérsias e diferenças de opiniões devido à instabilidade fenotípica e diferenças metodológicas (JACOBSON 1991; AZEVEDO DIAS; ABREU; RESENDE, 2014).

Fusarium oxysporum é causador de murcha vascular, com especificidade das *formae specialis* em vários hospedeiros (NELSON et al., 1983; ALEXOPOULOS et al., 1996). *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E. F. Smith) é um habitante de solo e vive saprofiticamente sobre a matéria orgânica e restos culturais, podendo sobreviver por vários anos na forma de clamidósporos e causa a murcha vascular em feijão caupi. Essa doença foi relatada pela primeira vez nos Estados Unidos, com rápida disseminação para outras áreas produtoras de caupi, como Nigéria e Brasil, com possível transmissão por sementes (RODRIGUES; MENEZES, 2005).

A planta apresenta inicialmente o amarelecimento das folhas mais velhas, que posteriormente progride para as demais folhas. Com alguns isolados fúngicos particularmente agressivos, as folhas podem se tornar marrom e rapidamente morrerem. Com o corte do caule, pode ser observada uma descoloração marrom no sistema vascular (WHEELER; RUSH, 2001; MICHEREFF; ANDRADE; MENEZES, 2005).

Os fungos fitopatogênicos habitantes do solo podem sobreviver por vários anos nesse ambiente por meio de estruturas de resistência, causando perdas em muitas culturas, por vezes, inviabilizando o pleno aproveitamento de vastas áreas agrícolas (AMBRÓSIO et al., 2009).

A murcha de Fusarium, causada pelo fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, é uma das principais doenças que ocorrem no feijão caupi. A ocorrência da doença é mais frequente em regiões secas com altas temperaturas. O sintoma típico da doença é a murcha, entretanto, em um primeiro estágio ocorre a redução do crescimento e clorose, acompanhada de queda prematura de folhas, seguida da murcha típica e a morte das plantas (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005).

Estes sintomas podem ser confundidos com aquelas causadas por ausência de fósforo. As margens de folhas infectadas podem tornar-se necróticas (ABAWI, 1989). O processo de infecção requer um ferimento natural ou artificial do hospedeiro. O fungo, então, invade os vasos provocando a obstrução dos mesmos. A alta infestação de nematóides proporciona uma maior incidência da murcha devido provavelmente aos danos causados por estes organismos (EMBRAPA, 2009c).

A estratégia mais viável para o controle da murcha de Fusarium é o uso de variedades resistentes ou tolerantes para a semeadura em solos infestados. Entretanto, recomendam-se outras medidas como: realizar rotação de culturas por mais de três anos, utilizar sementes sadias e tratadas com fungicidas, evitar condições de excesso ou falta de água, realizar com preparo de solo e adicionar matéria orgânica ao solo (SCHWARTZ et al., 1996).

2.4 Resistência genética e mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos

A resistência genética a doenças pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno (PARLEVLIET, 1997). A resistência tem como característica a redução da taxa da epidemia, por meio da diminuição do número e tamanho das lesões, da diminuição da produção de esporos e do aumento do período latente. Isso faz com que a população do patógeno seja reduzida, diminui a quantidade de inóculo e, conseqüentemente, a intensidade da doença (WANG; HARTMAN, 1992).

Embora aparentemente indefesas frente ao ataque de agressores ou até mesmo em condições adversas, as plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardamento ou até mesmo impedem a penetração de agentes fitopatogênicos, tais como,

fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos. As plantas reagem ainda sob estresse abiótico, como por exemplo, variações de temperatura, ausência de água ou tratamento com agentes químicos. Esta defesa é composta de resposta constitutiva, a qual já está presente nas plantas, e a resposta induzida, a qual ocorre após o ataque de fitopatógenos ou o início do estresse abiótico (EMBRAPA, 2009c).

Os mecanismos de defesa de uma planta podem ser estruturais e bioquímicos, ambos pré e/ou pós-formados em relação à tentativa de penetração do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais constituem-se em barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno, enquanto que os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno ou gerar condições adversas para a sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, devendo estar presentes em concentração adequada nas partes invadidas e em forma acessível ao patógeno, de tal maneira que mudanças na concentração da substância implique em alterações na expressão da doença (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008; STANGARLIN et al., 2011).

2.5 Influência da nutrição por esterco bovino e adubo químico NPK no controle de doenças de solo.

A capacidade que as plantas têm em se defender é sem dúvida influenciada pelo vigor e seu estágio fenológico. Plantas com deficiências nutricionais são normalmente mais vulneráveis ao ataque de patógenos do que outras em condições nutricionais ótimas. O equilíbrio nutricional é importante, pois plantas com excesso de nutrição podem tornar-se, também, mais predispostas às doenças. Os mecanismos da interação patógeno-hospedeiro-nutriente não são completamente conhecidos, mas admite-se hoje que a severidade pode ser reduzida por aumentar a “tolerância” às doenças, facilitar a evasão às doenças, aumentar a resistência fisiológica das plantas e reduzir do patógeno (ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 2005).

O uso de esterco bovino e compostos naturais agem como condicionadores orgânicos, podendo ser superiores aos fertilizantes sintéticos, por melhorarem os atributos biológicos, físicos e químicos do solo, incrementando a produtividade das plantas (BULLUCK et al., 2002). São os mais ricos em fibras. Ajudam a desenvolver organismos que são antagonistas de fungos causadores de doença de solo. Uma vaca produz cerca de 15 t de esterco fresco por ano, o que corresponde a aproximadamente a 78 kg de N (nitrogênio), 20 kg de P (fósforo), 93 kg de K (potássio) e 35 kg de Ca (cálcio) + Mg (magnésio), (WEINÄRTNER et al., 2006).

A maioria dos elementos minerais, requeridos para o crescimento das plantas, tem sido relada como responsável pelo aumento ou redução da severidade de ataque dos patógenos. Os efeitos do nitrogênio, fósforo e potássio sobre as doenças têm sido mais amplamente relatados. A forma NO₃-N geralmente decresce e a forma de NH₄-N aumenta o ataque dos patógenos. É impossível generalizar os efeitos de um nutriente em particular sobre as interações patógeno-planta. Se tratando de espécies de *Fusarium* em diferentes hospedeiros, observa-se que a fonte NO₃-N tende a reduzir e a de NH₄-N tende a aumentar a severidade de ataque do patógeno (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

2.6 Controle biológico de fitopatógenos

O controle biológico de fitopatógenos pode ser efetuado diretamente pela ação de microrganismos antagônicos não-patogênicos, existentes na natureza quase sempre na forma saprofítica, que agem diretamente sobre o patógeno. Essa ação pode se dar pela produção de antibióticos ou substâncias tóxicas (antibiose), pela predação ou por parasitismo, resultando em inibição bloqueio do desenvolvimento do patógeno ou mesmo em sua destruição. Muitas vezes, o microrganismo antagonista produz enzimas capazes de degradar as paredes celulares dos patógenos. A esse processo chamamos heterólise, em contrapartida à produção de enzimas degradativas liberadas pelo próprio patógeno, devido ao estresse sofrido pela falta de nutrientes. Neste caso o processo é denominado autólise. O controle biológico poderá se dar, também, de uma forma indireta pela competição que se estabelece entre o patógeno e um microrganismo por fontes de nutrientes e energia ou pelo espaço físico (MORAIS, 1992).

Bactérias antagônicas, de modo geral agem significativamente por antibiose e, ocasionalmente, por parasitismo e competição. Microrganismos que agem por antibiose, geralmente têm amplo espectro de ação, de forma que na inibição dos fungos a produção de substâncias tóxicas é mais efetiva do que qualquer outro mecanismo de ação envolvido (KUPPER et al., 2003).

Dentre os gêneros de bactérias antagonistas de maior prevalência encontram-se *Bacillus* spp., representantes da família Enterobacteriaceae (CAMPOS SILVA et al., 2008).

O gênero *Bacillus* spp. se destaca por formar endósporo e apresentar uma multiplicidade de mecanismos antagônicos. Possibilitando dessa forma, a sua longa manutenção e sobrevivência em nichos ecológicos específicos, com grande versatilidade

nos mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos (LANNA FILHO; FERRO; DE PINHO, 2010).

Diversos trabalhos científicos têm demonstrado o potencial que microrganismos endofíticos possuem de promoverem crescimento e/ou controlarem patogenias em plantas; caso essa potencialidade fosse verdadeiramente aplicada em sistemas agrícolas, esses microrganismos seriam alternativas viáveis e baseadas em princípios ecológicos em substituição aos inseticidas e defensivos agrícolas (SANTOS et al., 2011b).

Geralmente, bactérias e fungos endofíticos desempenham funções importantes no processo de adaptação da planta ao meio. Embora possam ser confundidos com patógenos latentes, estudos têm demonstrado que, em muitos casos, existe uma importante interação simbiótica com o hospedeiro, a qual envolve a produção de compostos que conferem resistência a fitopatógenos, além da produção de fitoreguladores que podem aumentar o desenvolvimento vegetal, entre outros. Por sua vez, os endófitos encontram na planta um habitat com nutrientes e com menor competição com outros microrganismos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; CAETANO, 2004).

Estudos realizados por (NETO et al., 2018) demonstraram que o uso de formulações contendo *Bacillus* são eficientes no crescimento de plantas e na indução de resistência ao controle da murcha do fusarium uma vez que alterações metabólicas importantes foram observadas ao comparadas com as diferenças entre as atividades das proteínas PR, confirmando que houve ativação da resistência sistêmica em tomate cultivar Santa Cruz, com controle de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pela aplicação de formulações baseado em *B. methylotrophicus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação e no Laboratório de Fitopatologia, localizado no Núcleo de Biotecnologia Agrônômica – NBA da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus de São Luís.

3.2 Preparo das mudas de Feijão caupi

Utilizou-se sementes de seis variedades de Feijão – Caupi BRS Aracê, BRS Pujante, BRS Guariba, BRS Tumucumaque, BR-17 Gurguéia e Manteiguinha. No primeiro experimento foram semeadas em vasos de capacidade de 2kg, contendo solo autoclavado e esterco de bovino autoclavado na proporção 3:1, e no segundo experimento

utilizou-se para adubação das plantas o NPK líquido (15-15-20), deixando-se duas plantas por vaso.

3.3 Obtenção dos isolados de *Bacillus* spp. e do isolado de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

Os isolados de *Bacillus* spp. e *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foram obtidos da Micoteca do Laboratório de Fitopatologia da UEMA. Sendo transferido para placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), e posteriormente repicados e transferidos para tubos de ensaio para conservação de culturas puras de isolados, Tabela 1.

Tabela 1. Isolados de *Bacillus* spp. e do desafiante *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* utilizados no experimento in vitro.

CÓDIGO	ISOLADOS	ESPÉCIES
MGSS 276	B12	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
MGSS 271	B41	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
MGSS 275	B7'	<i>Bacillus thuringiensis</i>
MGSS 291	B45	<i>Bacillus methylotrophicus</i>
MGSS 274	B47	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
MGSS 60	FOT	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i>

3.4 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação com esterco bovino.

O teste de resistência foi realizado com seis variedades de Feijão caupi BRS Aracê, BRS Pujante, BRS Guariba, BRS Tumucumaque, Br-17 Gurguéia e Manteiguinha no qual foram semeadas e inoculadas aos 30 dias no primeiro experimento. Para o preparo do inóculo, os isolados do fitopatógeno foram cultivados em placas de Petri com meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), mantidas em BOD durante sete dias a 25 ± 2 °C, sob o regime de alternância luminosa (12 h claro/12 h escuro). As suspensões de esporos foram ajustadas para a concentração para 1×10^6 conídios mL⁻¹ com auxílio da câmara de

Neubauer. A inoculação procedeu-se por ferimento no sistema radicular, através da abertura de um sulco em “meia lua” ao redor do colo da planta, onde depositou-se a suspensão no volume de 20 mL por planta, sendo duas plantas por vaso.

Os sintomas da doença foram avaliados aos 21 dias após a inoculação das plantas, utilizando-se uma escala que variou de 0 a 4 de acordo com os níveis de severidade, onde 0 = ausência de sintomas; 1 = ausência de sintomas externos de murcha e presença de escurecimento vascular confinada à raiz principal; 2 = sintomas iniciais da doença (amarelecimento e murcha) e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule; 3 = sintomas bem definidos da doença (amarelecimento, murcha, lesões foliares e seca de folhas) e escurecimento vascular atingindo o terço médio da planta; e 4 = sintomas bem definidos da doença e escurecimento vascular atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas pela escala de notas de Schoonhoven; Pastor-corrales, 1987.

Após a avaliação da severidade, fragmentos das plantas com sintomas foram coletados e reisolados para confirmação da presença do patógeno nas plantas inoculadas.

3.5 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação química.

No segundo experimento, utilizou-se NPK líquido na proporção de (15-15-20) como fertilizante, aos 37 dias inoculou-se o fitopatógeno em vasos com capacidade de 2kg, contendo duas plantas por vasos, realizou-se ferimento no sistema radicular, com abertura de um solo em tipo “meia lua” ao redor do colo das plantas, e adicionou-se 20 ml da suspensão de esporos preparada e ajustadas por plantas para a concentração para 1×10^6 conídios mL⁻¹ com auxílio da câmara de Neubauer. Aos 21 dias analisou-se a severidade da murcha de Fusarium nas plantas infestadas através da escala de notas de Schoonhoven; Pastor-corrales, 1987.

3.6 Análise do índice da doença

A partir dos dados obtidos com a escala de notas descrita no item anterior, foi calculado o índice de severidade da doença (SVD) pela equação 1, descrita por McKinney (1923) para os dois experimentos, com esterco bovino e adubação por NPK líquido na proporção de (15-15-20):

$$SVD = \left[\frac{(N1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)}{(N0 + N1 + N2 + N3 + N4) \times k} \right] \times 100$$

Em que: N0 é o número de plantas com doença na categoria 0, N1 é o número de plantas com doença na categoria 1, N2 é o número de plantas com doença na categoria

2, N3 é o número de plantas com doença na categoria 3, N4 é o número de plantas com doença na categoria 4 e k é o número de categorias (4). Para as avaliações de severidade (SVD) a análise de variância foi realizada em delineamento inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade e todas as análises foram realizadas utilizando o software INFOSTAT (DI RIENZO et al., 2018).

A avaliação do índice da doença foi realizada usando a seguinte escala de reação das cultivares, em: 0% = imunidade, 1-10% = altamente resistente, 11-20% = moderadamente resistente, 21-40% = moderadamente susceptível, 41- 60% = susceptível, 70% = altamente susceptível (FAWOLE, 1989).

3.7 Efeito da produção de metabólitos termoestáveis mediados por *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

No método para detecção qualitativa de antibióticos (MDA), acondicionou-se porções de 200 ml de BD (Batata-Dextrose) em frascos de Erlenmeyer, e nestes transferidos discos de meio BDA contendo a bactéria (*Bacillus* spp.), com sete dias de idade. Os frascos permaneceram durante 15 dias, sem agitação, a uma temperatura de $26 \pm 0,5$ °C, na presença de luz. Após esse período, foram adicionadas 3 g de Ágar em cada frasco, e estes autoclavados por 20 minutos a 120° C, e o caldo agarizado foi vertido em placas de Petri, de 9 cm de diâmetro. No centro das placas foram localizados os discos de cultura do patógeno e estas mantidas por 10 dias a uma temperatura de $26 \pm 0,5$ °C, na presença de luz, em câmara de germinação tipo BOD.

A avaliação do potencial de antagonismo foi realizada ao quarto, quinto e décimo dia medindo-se em dois sentidos diametralmente opostos com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia. Os diâmetros das colônias do patógeno foram comparados com a testemunha, cujo patógeno se desenvolveu em meio BDA. Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos cinco isolados de *Bacillus* e uma testemunha. Avaliando-se o fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* confrontados com isolados de *Bacillus* spp.

A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula de (P.I.C) (MENTEN et al., 1976), onde:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

3.7 Avaliação do antagonismo de *Bacillus* spp a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* in vitro pelo método do pareamento de círculo.

Para o estudo do efeito antagonista de *Bacillus* spp. x *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, realizou-se um experimento *in vitro*, pelo método de pareamento em círculo. Inicialmente, os isolados de *Bacillus* spp. foram cultivados em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por 48 horas e o isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por sete dias, após este período de cultivo transferiu-se assepticamente para placas de Petri com 9 cm de diâmetro contendo meio de cultura BDA, um disco de 6,0 mm de diâmetro do fitopatógeno, colocando-os no centro da placa. Com auxílio de uma alça de platina, inoculou-se a bactéria, na mesma placa formando um círculo com diâmetro, aproximadamente de 5 cm. Para o tratamento controle ou testemunha constou-se do fitopatógeno cultivado em meio BDA (MARIANO, 1993).

A avaliação foi efetuada durante dez dias, pela inibição do crescimento micelial, para isso foram efetuadas medições do diâmetro das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada, definindo-se uma média para cada colônia. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições.

A percentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula de (P.I.C) (MENTEN et al., 1976), onde:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão caupi ao *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação com esterco bovino.

Os resultados obtidos, no primeiro experimento que avaliou a reação de cultivares de Caupi ao *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* adubadas com esterco bovino, aos 21 dias posteriores a inoculação do fitopatógeno podem ser observados conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Reação de cultivares de feijão caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação com esterco bovino.

Cultivar	Severidade¹	Índice da doença (%)	Reação²
BRS Aracê	0,00a	0,00	Imune
BRS Pujante	0,00a	0,00	Imune
BRS Guariba	1,20ab	24	Moderadamente susceptível
Manteiguinha	1,20ab	24	Moderadamente susceptível
BRS Tumucumaque	1,30ab	26	Moderadamente susceptível
BR-17 Gurguéia	2,30b	46	Susceptível
CV %			98,98

¹Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

²Avaliação da intensidade da doença foi realizada usando a seguinte escala de avaliação de resistência: 0% = imunidade, 1-10% = altamente resistente, 11-20% = moderadamente resistente, 21-40% = moderadamente susceptível, 41- 60% = susceptível, 70% = altamente susceptível.

As cultivares BRS Aracê e BRS Pujante não apresentaram diferença significativa entre si, entretanto ao compará-las com a cultivar BR-17 Gurguéia notou-se diferença significativa, indicando ser a cultivar de maior susceptibilidade. Apesar disto, a BR-17 Gurguéia não diferiu significativamente das cultivares BRS Guariba, Manteiguinha e BRS Tumucumaque apresentam-se moderadamente susceptíveis segundo a escala de reação (FAWOLE, 1989). Ao realizar a avaliação de linhagens e cultivares de feijão caupi em relação a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, Albuquerque et al., (2001), encontraram linhagens resistentes, destacando-se a L-190.004, L-288.004 e L-253.008. Todavia, este autor descreve a cultivar, BR-17 Gurgéia como altamente suscetível.

Sobre a severidade da doença a cultivar BRS Aracê, apresentou reação de resistência sobre *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* quando relacionada a sintomatologia da doença, atribuindo a escala de reação 0, indicando imunidade. Na cultivar BRS Pujante (Figura 1-B) observou-se plantas com aspectos de nutrição, avaliando raiz, caule e folhas descartando sintomas ou presença da doença, admitindo índice 0% (Tabela 2).

As cultivares BRS Guariba, BRS Tumucumaque e Manteiguinha obtiveram resultados semelhantes entre si, com um percentual entre 24% e 26% de incidência tornando-as moderadamente susceptíveis a murcha de Fusarium (Tabela 2). As plantas

apresentaram sintomas característicos da doença com amarelecimento, perda de folhas, necrose e escurecimento vascular (Figura 1- C, D e F).

A cultivar BR-17 Gurguéia (Figura 1- E) apresentou o maior índice de infestação da doença com 46 %. Nessa cultivar, observou-se plantas em estágio 4, ou seja, com sintomas bem definidos da doença e escurecimento vascular atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas. Estes resultados corroboram com os de Rodrigues et al., (2006), que avaliaram a indução de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em Caupi e utilizaram as cultivas BR-17 Gurguéia e IPA-206 como testemunhas, detectaram índices de doença de 68,85 % e 66,04 % respectivamente, após 18 dias da inoculação do patógeno. Embora, na época de avaliação, os índices de doença observados tenham sido muito próximos, a expressão dos sintomas na cultivar IPA-206 foi mais tardia que na BR-17 Gurguéia.

Estes fatores estão relacionados às particularidades de ataque do fitopatógeno, Noronha et al., (2013) descreve às características dos fungos *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* agente causal da murcha de Fusarium o qual demonstra elevada agressividade e capacidade de sobrevivência no solo mesmo na ausência de plantas hospedeiras. Ainda ressalta que a identificação de fontes de resistência e o desenvolvimento de cultivares resistentes constituem na principal medida de controle destas doenças radiculares. Aliadas ao uso de práticas sustentáveis que ajudem na supressão de patógenos do solo.

Alguns autores como Bettiol et al., (2005) e Weinarter et al., (2006) relatam que solos com altos teores de matéria orgânica tendem a ser mais supressivos a patógenos, devido à capacidade de suportar maior atividade microbiana, melhorar a estrutura do solo propiciando melhor aeração e aumentar a retenção de umidade. O esterco bovino, por exemplo, é rico em fibras e ajuda no desenvolvimento de organismos antagonistas de fungos causadores de doenças de solo.

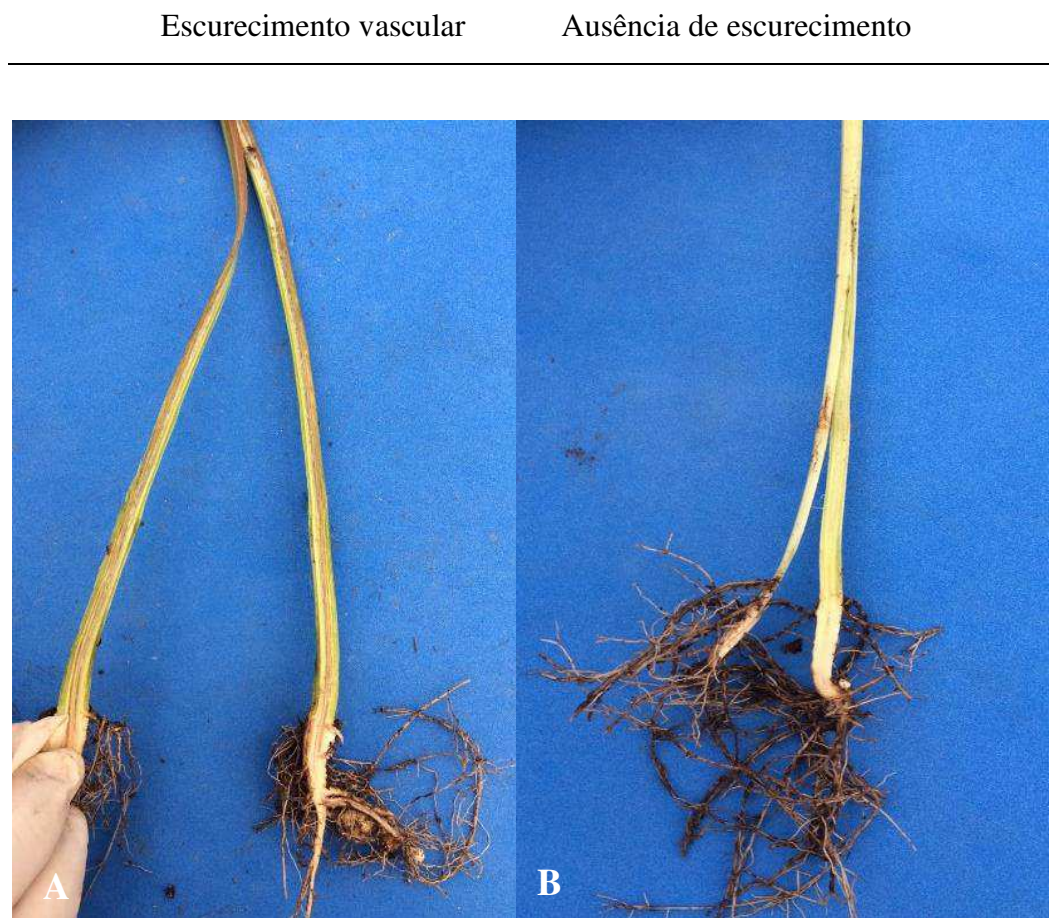
As cultivares de Feijão caupi com sintomas de murcha de Fusarium causadas pelo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* podem ser visualizadas mediante a Figura 1.

Figura 1. Cultivares de Feijão caupi com sintomas de murcha de Fusarium causadas por *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, BRS (A – Aracê), (B – Pujante), (C – Guariba), (D – Tumucumaque), E (BR-17 Gurguéia) e F (Manteiguinha).



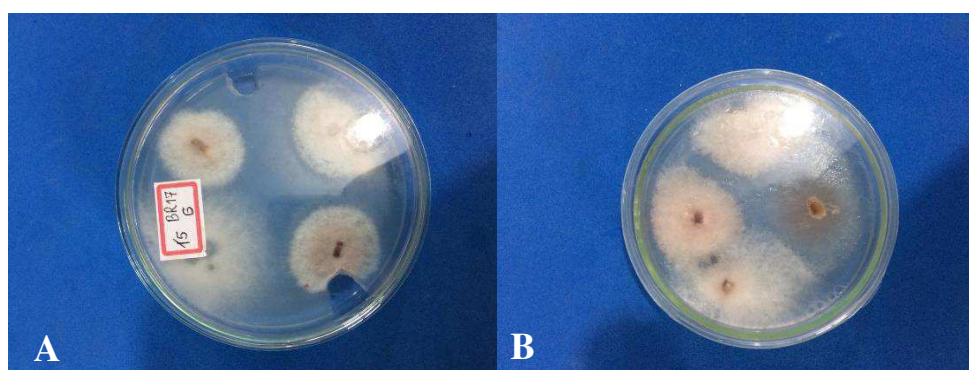
. A figura 2, demonstra o sistema vascular de plantas com a presença de murcha de Fusarium e plantas com ausência da doença, verificadas durante à análise visual.

Figura 2. Planta com presença de murcha de Fusarium, (A) cultivar BR -17 Gurguéia com escurecimentos vasculares e planta (B) cultivar BRS-pujante aparentemente sadia, livre de sintomas da doença.



Houve a confirmação do agente etiológico *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* mediante o reisolamento de partes do caule da planta, com escurecimento vascular, estão ilustradas na Figura 3.

Figura 3. Confirmação da presença do fitopatógeno em plantas de caupi, cultivar BR- 17 Gurguéia.



4. 2 Teste de resistência de diferentes variedades de Feijão caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação química.

Neste experimento, os resultados obtidos para o teste de resistência entre as diferentes cultivares de Caupi, adubadas com fertilizante NPK líquido, frente ao *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* após a inoculação e análise da severidade da murcha de Fusarium, são descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Reação de cultivares de feijão caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sob adubação química.

Cultivar	Severidade ¹	Índice da doença (%)	Reação ²
BRS Aracê	0,20 a	4	Altamente resistente
BRS Pujante	0,40 a	8	Altamente resistente
Manteiguinha	1,60 ab	32	Moderadamente susceptível
BR-17 Gurguéia	2,40 bc	53,33	Susceptível
BRS Tumucumaque	2,60 bc	49,09	Susceptível
BRS Guariba	3,90 c	78	Altamente susceptível
CV%			43,16

¹Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

²Avaliação da intensidade da doença foi realizada usando a seguinte escala de avaliação de resistência: 0% = imunidade, 1-10% = altamente resistente, 11-20% = moderadamente resistente, 21-40% = moderadamente susceptível, 41- 60% = susceptível, 70% = altamente susceptível.

Os resultados evidenciam a existência de proporcionalidade nos experimentos, realizados em casa de vegetação, em que as cultivares BRS Aracê e BRS Pujante demonstraram resistência a doença, quando testadas sob adubação com esterco bovino e fertilizante químico. Para o segundo experimento, adotou-se NPK líquido (na proporção: 15-15-20) como alternativa à fertilização das cultivares, fornecendo os macronutrientes necessários para bom desenvolvimento destes vegetais. Entretanto a nutrição determinou em grande parte a resistência ou suscetibilidade da planta hospedeira aos patógenos, pois a disponibilidade e principalmente as quantidades necessárias de nutrientes para planta influenciam nesse aspecto.

Observações feitas por Zambolim et al., (2005) ressaltam que as formas de nitrogênio também apresentam efeitos diretos sobre a sobrevivência, reprodução, crescimento e virulência do patógeno. Cada fonte de nitrogênio tem efeito específico sobre as doenças, isto é, aumenta ou diminui sua severidade. Como exemplo, a forma

NO₃ -N geralmente decresce a murcha de *Fusarium*, mas aumenta a murcha de *Verticillium* sp. e de *Ralstonia solanacearum*. Geralmente, doenças causadas por *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Aphanomyces* podem ser reduzidas por nitrato e aumentadas por amônia enquanto que *Streptomyces* responde de maneira inversa. O efeito de cada forma de nitrogênio sobre as doenças está associado ao pH. As doenças que aumentam na presença da amônia são geralmente mais severas em pH ácido, enquanto aquelas que são aumentadas pelo nitrato são geralmente mais severas em pH neutro a alcalino.

Nesse experimento, constatou-se que as cultivares BR-17 Gurguéia, BRS Tumucumaque e BRS Guariba diferiram-se das cultivares BRS- Aracê e Pujante. Essas cultivares, apresentaram maior susceptibilidade a murcha de *Fusarium*, entretanto não foram constatadas diferenças significativas entre as cultivares BR-17 Gurguéia e BRS Tumucumaque, e a cultivar BRS Guariba obteve maior índice de susceptibilidade a doença (Tabela 3).

Observou-se que as cultivares BRS Tumucumaque, Guariba haviam sido classificadas como moderadamente suscetível no primeiro experimento, já no segundo foram considerados suscetível e altamente suscetível. Estes resultados podem estar relacionados a fertilização química recebida no segundo experimento uma vez que, os nutrientes minerais podem também aumentar ou diminuir a resistência de plantas ao patógeno. Woltz et al., (1973), avaliou a fusariose no tomateiro e notou que elevados níveis de fósforo no solo aumenta a severidade da murcha, e que a combinação de calagem elevada e baixo fósforo no solo reduziu a severidade da doença.

Os sintomas de murcha de *Fusarium* causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* nas cultivares de Feijão caupi adubas com o fertilizante líquido NPK, podem ser observados através da figura 4.

Figura 4. Cultivares de Feijão caupi com sintomas de murcha de Fusarium causadas por fitopatógeno *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, BRS (A- Aracê), (B – Guariba), (C – Pujante), (D – Tumucumaque), (E BR-17 Gurguéia) e F - Manteiguinha.



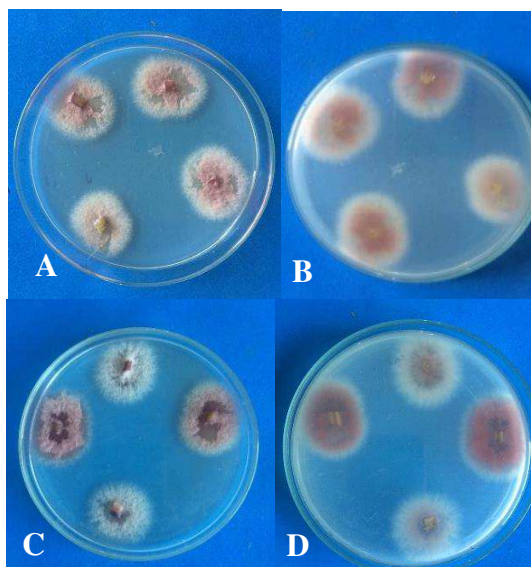
Análise visual do sistema vascular de plantas com a presença de murcha de *Fusarium* e plantas com ausência dessa doença, podem ser verificados na figura 5 (A-B).

Figura 5. Planta com presença de murcha de *Fusarium*, (A) cultivar BRS-Guariba com escurecimentos vasculares e planta (B) cultivar BRS-Pujante aparentemente sadia, livre de sintomas da doença.



O diagnóstico do agente etiológico *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* mediante o reisolamento de partes do caule da planta, para realização de teste *in vitro*, em cultivares BRS-Guariba (A-B) e BR-17 Gurguéia (B-C), pode ser verificado conforme a figura 6.

Figura 6. Placas de Petri contendo colônias do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* reisolado de partes do caule das plantas infestadas confirmando *in vitro* a presença desse fitopatógeno nas cultivares de Caupi (A-B) BRS-Guariba e (B-C) BRS-Gurgueia



4.3 Efeito da produção de metabólitos termoestáveis mediados por *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*

Com base no teste de metabólitos termoestáveis, descritos na tabela 4, avaliou-se o antagonismo de cinco isolados de *Bacillus* spp. ao fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, onde todos os tratamentos diferiram estatisticamente da testemunha. Os tratamentos: MGSS-276, MGSS-271, MGSS-274 e MGSS-29 não apresentaram diferença significativa entre si, pois obtiveram as menores médias de diâmetro da colônia, entretanto, diferiram estatisticamente do tratamento MGSS – 275 e da testemunha. A testemunha apresentou maior diâmetro de desenvolvimento do fungo. Estes resultados corroboram com os citados por Lima et al., (2014) visto que, os isolados B12– (MGSS 276), B41– (MGSS 271) B 22', B45 – (MGSS 291), B47- (MGSS 274) e B 25 induziram as menores médias de diâmetro da colônia do patógeno.

Estes isolados também apresentaram maiores índices de biocontrole ao *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, já que as percentagens de inibição do crescimento micelial contra o fungo patogênico foram 100% de antagonismo. Apenas o isolado MGSS – 275 obteve uma percentagem de inibição do crescimento micelial de 74,17 % em relação aos demais tratamentos, entretanto ao compara-lo com a testemunha seu índice de inibição atinge valores superiores.

Tabela 4. Antagonismo de *Bacillus* spp. a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* através de metabólitos termoestáveis.

Tratamentos	Ø Colônia (cm)			PIC %
	4 dias	5 dias	10 dias	
MGSS – 276	0,00 a	0,00 a	0,00 a	100
MGSS – 271	0,00 a	0,00 a	0,00 a	100
MGSS – 274	0,00 a	0,00 a	0,00 a	100
MGSS- 291	0,00 a	0,00 a	0,00 a	100
MGSS – 275	0,95 b	1,11 b	2,28 b	74,17
Testemunha	4,81 c	5,88 c	8,83 c	-
CV %	26,78	12,90	16,83	

Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Testemunha = *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. MGSS – 275 (*Bacillus thuringiensis*), MGSS – 271 (*Bacillus methylotrophicus*), MGSS – 291 (*Bacillus amyloliquefaciens*), MGSS – 276 (*Bacillus methylotrophicus*). PIC -Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial.

Comparando os resultados com os encontrados por Lima et. al., (2014) sobre inibição do crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* pelos antibióticos secretados em caldo agarizado por dez isolados de *Bacillus* spp., cinco diferiram estatisticamente, entre eles destacam os isolados (MGSS 276) e (MGSS 271) onde evidenciaram que seus produtos antibióticos foram capazes de inibir o crescimento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* em 67,88 e 57,66 %, respectivamente.

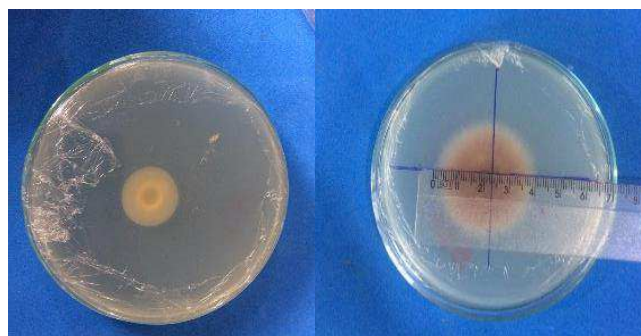
Sobrinho et al., (2018) obteve resultados parecidos ao analisar a atividade antagonista de *Bacillus subtilis*, testada para dois isolados do fungo *Fusarium solani*, os métodos de antagonismo em que *B. subtilis* promoveram maiores porcentagens de inibição do crescimento micelial dos isolados de *F. solani* foi por metabólitos termoestáveis: 81,7 e 78,2% para os isolados Anagé e Dom Basílio, respectivamente.

Vale ressaltar que mesmo após serem autoclavados por 20 min a 120° C os metabolitos ainda possuem alta atividade inibitória contra fungos pois todos provocaram forte inibição do crescimento micelial do fitopatógeno.

O crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, em meio agarizado com metabólitos secretados por isolados de *Bacillus* spp. e a testemunha aos quatro e dez dias, pode ser visualizado conforme a figura 7.

Figura 7. Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* spp. através metabolitos termoestáveis. MGSS – 275 (*Bacillus thuringiensis*) Testemunha – (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*).

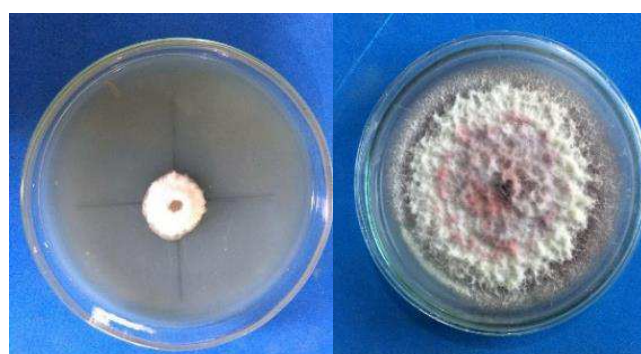
4 dias



MGSS 275

TEST.

10 dias



MGSS 275

TEST.

4.4 Avaliação do antagonismo de *Bacillus* spp. a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* *in vitro* pelo método do pareamento de círculo.

Os resultados verificados no experimento *in vitro* com o *Bacillus* spp. inibindo o crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5. Inibição do crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* por *Bacillus* spp. pelo método do pareamento em círculo.

Tratamentos	Ø Colônia (cm)			PIC %
	4 dias	5 dias	10 dias	
MGSS – 271	2,60 a	3,66 a	4,81 a	46,55
MGSS – 274	2,88 a	3,48 a	3,75 a	58,33
MGSS – 275	3,57 a	4,36 a	5,06 a	43,77
MGSS- 291	3,60 a	3,96 a	4,38 a	51,33
MGSS – 276	4,32ab	4,36 a	5,71 a	36,55
Testemunha	5,65 b	8,07 b	9,00 b	-
CV %	27,59	22,73	18,92	

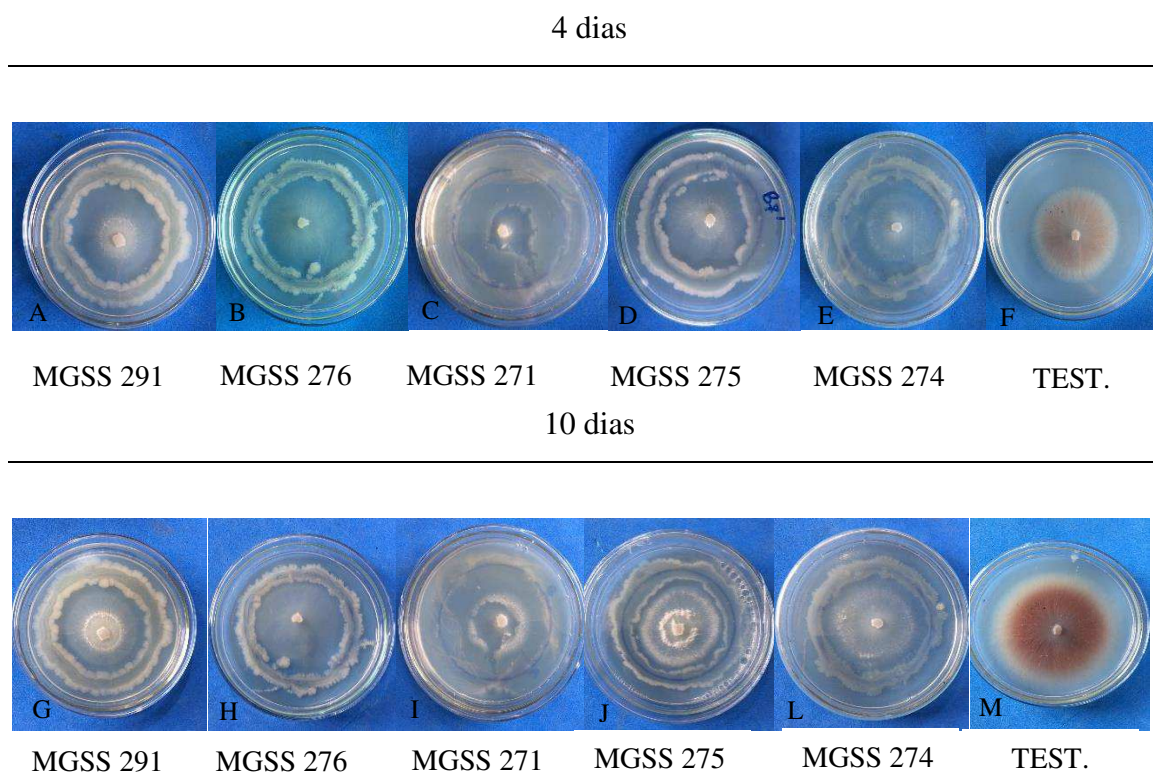
Médias seguidas da mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Testemunha = *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. MGSS – 275 (*Bacillus thuringiensis*), MGSS – 271 (*Bacillus methylotrophicus*), MGSS – 291 (*Bacillus amyloliquefaciens*), MGSS – 276 (*Bacillus methylotrophicus*). PIC -Porcentagem de Inibição do Crescimento Micelial.

Verificou-se no experimento baseado no método do círculo aos quatro dias que os tratamentos não diferiram estaticamente entre si. Entretanto, aos cinco e dez dias constatou-se que todos os tratamentos com o isolado *Bacillus* spp. apresentaram controle no crescimento do diâmetro da colônia e efeito inibidor sobre o crescimento micelial do fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Resultado similar foi obtido por Lima et al. (2014), ao verificarem a ação de isolados de *Bacillus* ssp. sobre o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* através do método do círculo, também aos 10 dias e, constatarem o efeito inibidor dos isolados da bactéria sobre esse fungo.

Braga Junior et al (2017), observando o controle de fitopatógenos por meio de isolados de *Bacillus subtilis* verificaram aos nove dias que entre os sete tratamentos adotados com essa bactéria para o controle do fungo *Fusarium subglutinans*, apenas 1 tratamento diferiu estaticamente da testemunha. Ao comparar o resultado encontrado neste trabalho com o descrito por esses autores, observa-se que os isolados de *Bacillus* ssp. a partir dos cinco dias são capazes de inibir o crescimento do fungo *F.oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. Entretanto, é importante destacar que as espécies de fungos são diferentes assim como as espécies de isolados adotados. Remuska et al (2007), constataram que a inibição dos fitopatógenos pelo antagonista pode ser observada pela formação do halo de inibição, que se manifesta como uma limitação do crescimento do fungo pela bactéria, as mesmas características observadas no efeito inibitório que os isolados de *Bacillus* causaram ao fungo.

A demonstração da atividade antagonista *in vitro* de *Bacillus* spp. ao fungo fitopatogênico *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* pelo método do círculo, pode ser observado mediante a figura 8.

Figura 8. Atividade antagonista *in vitro* de *Bacillus* spp. contra fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* pelo pareamento em método do círculo.



5 CONCLUSÃO

- As cultivares BRS Aracê e BRS Pujante apresentaram reação de resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* enquanto cultivares BR-17 Gurguéia, BRS Tumucumaque e BRS Guariba apresentarem suscetibilidade à murcha de *Fusarium*;
- Os resultados evidenciaram a cultivar manteiguinha moderadamente resistente a doença;
- Na avaliação do potencial de metabólitos termoestáveis todas espécies de *Bacillus* testadas demonstraram antagonismo ao *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, através da inibição o crescimento micelial do patógeno;

- No pareamento dos isolados de *Bacillus* spp. com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* pelo método de círculo, constatou-se que os isolados apresentaram efeito inibidor sobre o crescimento micelial do patógeno;
- Desta forma, a identificação de variedades resistentes e o controle biológico por microrganismos apresentam-se como alternativas viáveis para serem inseridas no manejo da murcha de Fusarium do Feijão caupi.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAWI, G. S. Root rots. In: Schwartz, h. f. & pastor-corrales, m. a. (eds). **bean production problems in the tropics**. cali: ciat, 1989. p. 105-57.

ALBUQUERQUE, M.P; COELHO, R. S. B; PERE, J. O. Avaliação de linhagens e cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) em relação a *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. **Caderno Ômega, Série Agronomia**, n.12, Jun., 2001.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**, 4 ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1996. 880 p.

AMBRÓSIO, M. M. Q; BUENO, C. J; PADOVANI, C. R; SOUZA, N. L; Sobrevivência de fungos fitopatogênicos habitantes do solo, em microcosmo, simulando solarização com prévia incorporação de materiais orgânicos. **Manual de Fitopatologia**, Botucatu, v. 35, n. 1, p. 20-25, 2009.

ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIRMMERMANN. M. J. DE O.; **Cultura do feijoeiro comum no brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996.

ASSUNÇÃO, I.P.; MICHEREFF, S.J.; MIZUBUTI, E.S.G.; BROMMONSCHENKEL, S.H. Influência da intensidade da murcha-de-fusário no rendimento do caupi. **Fitopatologia Brasileira** 28:615-619. 2003.

ATHAYDE SOBRINHO, C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. **In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Ed.). Feijão-Caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 463-486, 2005.

AZEVEDO DIAS, J.S.; ABREU, M. S.; RESENDE, M. L. V.; Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) quanto à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade em cultivares de bananeira diferenciadoras de raças no Brasil. **Biota Amazônia** ISSN 2179-5746, Macapá, v. 4, n. 4, p. 60-65, 2014.

BENVINDO, R. N.; SILVA, J. A. L.; FREIRE FILHO, F. R.; ALMEIDA, A. L. G.; OLIVEIRA, J. T. S.; BEZERRA, A. A. C. Avaliação de genótipos de feijão-caupi de porte semi- prostrado em cultivo de sequeiro e irrigado. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 1, p. 23-28, 2010.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: MICHEREFF; S. J.; BARROS, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, p. 1-15, 2001.

BRAGA JUNIOR, G. M.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; CHAGAS, L. F.B.; CARVALHO FILHO, M. R.; MILLER, L. O.; SANTOS, G. R. Controle biológico de fitopatógenos por *Bacillus subtilis* *in vitro*. **Biota Amazônia**, Macapá, v. 7, n. 3, p. 45-51, 2017.

BULLUCK, L.R.; BROSIUS, M.G.; EVANYLO, K.; RISTAINO, J.B. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.19, n.2, p.147-160, 2002.

- CAMPOS SILVA, J.R.; SOUZA, R.M.; ZACARONE, A.B.; SILVA, L.H.C.P.; CASTRO, A.M.S. Bactérias endofíticas no controle e inibição *in vitro* de *Pseudomonas syringae* pv. tomate, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, p.1062-1072, 2008.
- CARVALHO, M.; BEBELI, P.J.; PEREIRA, G.; CASTRO, I.; European cowpea landraces for a more sustainable agriculture system and novel foods. **J. Sci. Food Agric.**, n. November 2016, 2017b.
- CARVALHO, M.; LINO NETO, T.; ROSA, E.; CARDINE, V.; Cowpea: a legume crop for a challenging environment. **J. Sci. Food Agric.**, n. February, 2017a.
- COELHO, R.S.B. Doenças fúngicas do caupi. **In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DO CAUPI**, 5., 2001, Teresina. Anais... Teresina: Embrapa Meio Norte, 2001. p. 321- 322.
- COSTA, E. M. Resposta de duas cultivares de feijão-caupi à inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em ambiente protegido. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v.9, n.4, p.489-494, 2014.
- COUTINHO, P. W. R.; SILVA, D. M. S.; SALDANHA, E. C. M.; OKUMURA, R. S.; SILVA JÚNIOR, M. L.; Doses de fósforo na cultura do feijão-caupi na região nordeste do Estado do Pará. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 8, n. 1, p. 66-73, janeiro-abril, 2014.
- CUNHA, F. L. **Sementes da Paixão e as Políticas Públicas de Distribuição de Sementes na Paraíba**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2013.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. **InfoStat versión 2018**. Centro de Transferencia InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. BRS aracê. Cultivar de feijão-caupi com grãos de cor verde-oliva e rica em ferro e zinco. 2009b.
- EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. BRS Guariba – Nova Cultivar de Feijão-Caupi para o Estado do Amazonas. 2009a.
- EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Comunicado técnico BRS Tumucumaque – Cultivar de Feijão-Caupi com Valor Nutritivo para o Amazonas. 2014
- EMBRAPA, **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Doenças do feijoeiro causadas por patógenos de solo, Goiânia, GO – 1990.
- EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. Porto Velho, RO 2009c.
- EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. 1998. BR 17 - Gurguéia. Embrapa MEIO - NORTE. 1998.

- FAWOLE, E.A. Evaluation of cowpea lines for resistance to wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. **Fitopatol. bras.** (14) :232- 234. 1989.
- FREIRE FILHO, F. R.; Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios -Teresina: **Embrapa Meio-Norte**, 2011. 84 p. : il. ; 27 cm.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (**IBGE**). Levantamento sistemático da produção agrícola do feijão. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br>> Acesso em: 12 de junho de 2019.
- JACOBSON, D. J.; GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*: A case study of diversity within a formae specialis. **Phytopathology**, v. 81, n. 9, p. 1064-1067, 1991.
- KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. de. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.
- KURAMAE, E. E.; SOUZA, N. L. de; Variabilidade genética entre formae speciales de *Fusarium oxysporum* e raças 1 e 2 de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* através de RAPD e sequências de regiões ITS e rDNA. **Acta Scientiarum**. Maringá, v. 24, n. 5, p.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; DE PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- LIMA, G. S.A.; ASSUNÇÃO, I. P.; VALLE, L. A.C, **In Cap**: Controle Genético de Doenças Radiculares. Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.
- LIMA, J. R. S.; ANTONINO, A. C. D.; LIRA, C. A. B. O.; SOUZA, E. S.; SILVA I. F.. Balanço de energia e evapotranspiração de feijão caupi sob condições de sequeiro. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 1, p. 65-74, jan-mar, 2011. ISSN 1806-6690.
- LIMA, O. D. R; OLIVEIRA, L. D. J. M. G. D; SILVA, M. S. B. D. S; RODRIGUES, A. A. C; AÇÃO ANTIFÚNGICA *in vitro* DE ISOLADOS DE *Bacillus ssp.* SOBRE *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 57 – 64, out. – dez., 2014.
- MARIANO, R.L.R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógeno de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo, v.1, p. 369-409, 1993.
- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26,n.5, p.195-218, 1923.
- MENTEN, J.OM.; MINUSSI, C.C.; CASTRO, C.; KIMATI, H. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophominia phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M.; Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais – Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 2005. 398 p. : il.

MORAIS, W. B.C; Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, 27, S/N: 175-190, Abr. 1992.

MOREIRA, C. G. Á.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; BONALDO, S. M.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. DA S. Caracterização parcial de frações obtidas de extratos de *Cymbopogon nardus* com atividade elicitora de fitoalexinas em sorgo e soja e efeito sobre *Colletotrichum lagenarium*. **Summa Phytopathologica**, v.34, n.4, p.332-7, 2008.

MOREIRA, J. A. A.; STONE, L. F.; BIAVA, M. Feijão: o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Embrapa Informação Tecnológica**, 2003. p. 39-54.

NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. O. *Fusarium* species; An illustrated Manual for identification. University Park and London, USA The Pennsylvania State University Press. 1983.

NETO, J. R. M. C.; CHAVES, R. R.; SARDINHA, D. H. S.; MELO, L. G. L.; RODRIGUES, A. A. C. Bacterial Formulations in Induction of Resistance and Growth Promotion of Tomato Plants. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 10, No. 10; 2018 ISSN 1916-9752 E-ISSN 1916-9760

NORONHA, M. A.; LOPES, C. L. R. B. P.; OLIVEIRA, B. M. M.; VENTURA, H. P.; TÔRRES, R. J. A.; MICHEREFF, S. J.; SILVA, K. J. D.; REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE FEIJÃO-CAUPI A *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* E *Sclerotium rolfsi*. **III CONAB Congresso Nacional de Feijão Caupi**. Recife-PE, 2013.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. et al. (Eds.). *Advances in cowpea research*. Ibadan: **Sayce Publishing**, 1997. p. 1–12.

PARLEVLIET, J.E. Present concepts in breeding for disease resistance. **Fitopatologia Brasileira**, v.22, p.7-15, 1997. Suplemento.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; CAETANO, L. C. **Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas**. Boletim Latino americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, Santiago, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004

REMUSKA, A. C.; PRIA, M. D. EFEITO DE *Bacillus thuringiensis* E *Trichoderma* sp. NO CRESCIMENTO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS Publ. **UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**, Ponta Grossa, 13 (3): 31-36, dez. 2007.

RODRIGUES, A. A. C.; MENEZES, Maria. **Identification and pathogenic chacterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds..** *Mycopathologia JCR*, Holanda, v. 159, p. 79-85, 2005.

RODRIGUES, A.A.C.; BEZERRA NETO, E. & COELHO, R.S.B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira** 31:492-499. 2006.

SANTANA, J. S.; FEITOZA, M. L.; OLIVEIRA G. C.; SILVA, W. A.; Avaliação de npk e doses de biofertilizante orgânico no crescimento do feijão-caupi **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada** v. 12, nº 5, Fortaleza, p. 2877 – 2889, Jul - Ago, 2018

SANTOS, C. A. F; Cultivares de feijão-caupi para o Vale do São Francisco, **Circular técnica Embrapa**, 2011a.

SANTOS, T. T.; VARAVALLLO, M. A.; Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semana: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 199-212, jul./dez. 2011b.

SARTORATO A, RAVA CA (1994) Murcha ou amarelecimento de *Fusarium*. **In:** Sartorato A, Rava CA (Eds.) Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. Brasília DF. EMBRAPA-SPI. pp.175-190.

SCHOONHOVEN, A.V.; PASTOR-CORRALES, M.A. Standard system for the evaluation of bean germplasm. **Cali: CIAT**, 1987. 53p.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. **In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p.227-248.

SCHWARTZ, H. F.; BRICK, A. M.; NULAND, D. S.; FRANC, G. D. Dry bean production and pest management. Fort Collins: Colorado State University, 1996. 106p. (Regional Bulletin, 562).

SILVA, M. S. B. S; RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIRA, L. J. M. G.; SILVA, E. K. C.; PEREIRA, T. S.; Sanidade de sementes de arroz, biocontrole, caracterização e transmissão de *Curvularia lunata* em semente-plântula de arroz. **Revista Ceres**, v. 61, n. 4, p. 511-517, 2014.

SOARES, P. L. M.; **Estudo do controle biológico de fitonematóides com fungos nematófagos (Tese de doutorado)**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, Brasil. 2006.

SOBRINHO, G. G. R.; BRITO, N. D.; SANTOS, A.; NOVAES, Q. S. ATIVIDADE ANTAGONISTA DE *Bacillus subtilis* SOBRE DOIS ISOLADOS DE *Fusarium solani* DO MARACUJAZEIRO, POR DIFERENTES MÉTODOS. **Enciclopédia Biosfera**, centro científico conhecer - goiânia, v.15 n.28; p. 2018.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Volume 10, número 1 - 2011, p 18-46.

VALE, J. C.; BERTINI, C; BORÉM, A.; Feijão-Caupi do plantio a colheita. **EDITORA UFV** ISBN: 9788572695787, 2017.

WANG, T.C.; HARTMAN, G.L. Epidemiology of soybean rust and breeding for host resistance. *Plant Protection Bulletin*, v.34, p.109-149, 1992.

WEINÄRTNER, M. A.; ALDRIGHI, C. F. S.; MEDEIROS C. A. B. PRÁTICAS AGROECOLÓGICAS Adubação Orgânica. **Embrapa Clima Temperado**, 2006.

WHEELER, T.; RUSH, C.M.; Soil inhabitant. In: Maloy, O.C. & Murray, T.D. (Eds.) Encyclopedia of Plant Pathology. New York. JohnWiley & Sons. pp.933-934. 2001.

WINDELS, C. E. Current status of *Fusarium taxonomy*. **Phytopathology**, v. 81, n. 9, p. 1048-1051, 1991.

WOLTZ, S. S. ; JONES, J. P. Interactions in source of nitrogen fertilizer and liming procedure in the control of *Fusarium* wilt of tomato. **Hort. Science** 8: 137-8. 1973.

XAVIER, M.V.A; BRITO, S.S.S.; OLIVEIRA, C.R.F.; MATOS, C.H.C. PINTO, M.A.D.S.C. Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão-caupi. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n. esp., p.214-217, 2012.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; F. X.R. VALE, **In Cap: Nutrição Mineral e Patógenos Radiculares**, Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais. Recife : UFRPE, Imprensa Universitária, 2005.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A.; **Resistência a doenças induzidas pela nutrição mineral das plantas**.RAAP, Volume 1, 1993.

ZILLI, J. E. MARSON, L. C.; MARSON, B. F.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER G. R.; Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima. **Revista ACTA Amazônica**, v.39, n.4, p.749-758, 2009.