

MAYANE DE SOUZA BARBOSA

EFEITO DO BIOPROTETOR COM *Cunninghamella elegans* E DA QUITOSANA DE
CRUSTÁCEO NO ESTADO NUTRICIONAL E NA DEFESA DE *Vigna unguiculata*
(L.) Walp CONTRA *Sclerotium rolfsii* Sacc

Serra Talhada – PE

2017

MAYANE DE SOUZA BARBOSA

EFEITO DO BIOPROTETOR COM *Cunninghamella elegans* E DA QUITOSANA DE
CRUSTÁCEO NO ESTADO NUTRICIONAL E NA DEFESA DE *Vigna unguiculata*
(L.) Walp CONTRA *Sclerotium rolfsii* Sacc

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Universidade Federal Rural de
Pernambuco - Unidade Acadêmica de Serra
Talhada - para obtenção do título de Mestre
em Produção Vegetal.

ORIENTADORA: PROF^a. CAROLINA ETIENNE DE
ROSÁLIA SILVA E SANTOS

Co-orientadores: Prof. Dr. Newton Pereira
Stamford e Dr. Antônio Félix da Costa

Serra Talhada – PE

2017

B238e Barbosa, Mayane de Souza

Efeito do bioprotetor com *Cunninghamella elegans* e da Quitosana de crustáceo no estado nutricional e na defesa de *Vigna unguiculata* (L.) Walp contra *Sclerotium rolfsii* Sacc / Mayane de Souza Barbosa.

81 f. : il.

Orientador: Carolina Etienne de Rosália Silva e Santos

Coorientadores: Newton Pereira Stamford e Antônio Félix da Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Serra Talhada, PE, 2017.

Inclui referências.

1. Biofertilizantes. 2. Bioprotetor . 3. Quitosana. I. Santos, Carolina Etienne de Rosália Silva e, orient. II. Stamford, Newton Pereira, coorient. III. Costa, Antônio Félix da, coorient. IV. Título.

CDD 631

MAYANE DE SOUZA BARBOSA

EFEITO DO BIOPROTETOR COM *Cunninghamella elegans* E DA QUITOSANA DE
CRUSTÁCEO NO ESTADO NUTRICIONAL E NA DEFESA DE *Vigna unguiculata*
(L.) Walp CONTRA *Sclerotium rolfsii* Sacc

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

APROVADO em ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Carolina Etienne R. S. Santos
(Orientadora)

Rossanna Barbosa Pragana
(Examinador-Externo)

Ana Dolores Santiago de Freitas
(Examinador - Externo)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que sempre estiveram do meu lado, me apoiando, me incentivando, me dando força para continuar a jornada. Souberam compreender a minha ausência e muitas vezes o meu silêncio, principalmente durante a fase de realização deste trabalho: minha mãe Dilza do Socorro Souza Barbosa, meu pai Paulo Roberto Monteiro Barbosa e minhas irmãs Maylem Barbosa e Miriana Barbosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças nas dificuldades diversas que tive nesse caminho que só Ele conhece, por ter segurado minha mão e ter me levantado, ajudando-me a andar nos momentos difíceis. “Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque Tu estás comigo” (Salmos 23:4).

A Nossa Senhora de Nazaré a qual tenho grande devoção.

A minha família por sempre ter me ajudado na caminhada e apoiado em meus objetivos de vida. Minha mãezinha querida que sempre me atendeu nos momentos difíceis, meu pai Paulo Roberto, minhas irmãs Maylem e Miriana, por todas as palavras de força, carinho, amor e dedicação em todos os momentos em que precisei.

A todos os meus familiares tios, primas e primos que sempre me apoiaram na caminhada, em especial minha dinda Mory e meus tios Wendel, Sinita e Dicleudi.

Ao seu Eptácio e família que me acolheram como uma filha durante minha estadia em Recife; a vocês toda a minha gratidão.

Ao meu noivo Paulo Iran e sua família, dona Fé, Felícia e Felipe por todo carinho, compreensão e ajuda nos meus estudos e momentos difíceis.

Às professoras Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos e Ana Dolores Santiago de Freitas por toda orientação, compreensão, ensinamentos e principalmente paciência para me ajudar nos momentos que precisei. Apreendi muito com vocês sobre vida e meio acadêmicos; agradecimentos infinitos pela experiência transmitida em cada conversa.

À professora Rossanna Pragrana por toda compreensão e ajuda, exemplo de professora, pela maneira especial em que conversa com os alunos.

Ao meu co-orientador Newton Pereira Stamford e toda sua família por toda dedicação, compreensão, ajuda, auxílios na pesquisa, conhecimentos transmitidos e, sobretudo paciência com a realização desse trabalho.

A Lúcia Raquel Ramos Berger, nenhuma palavra seria suficiente para lhe agradecer por toda ajuda, apoio, amizade, compreensão e acima de tudo pela pessoa maravilhosa que Deus colocou em meu caminho nos momentos de aflição; ser-lhe-ei eternamente grata.

Ao meu co-orientador inestimável Dr. Antônio Félix da Costa, que me acolheu desde o início da coorientação, por toda atenção, compreensão, ajuda e dedicação aos sábados, domingos e feriados na casa de vegetação e toda a sua equipe do IPA, em especial a Emanuelle Rodrigues e Luciana Gonçalves.

A professora Lillian Willadino pela orientação e ajuda nesse trabalho e toda sua equipe que sempre me apoiou e foi como uma família para mim; todos do laboratório de Cultura de Tecido Vegetal: Lindomar, Marciana, Marta, Rodolfo, Ronaldo, Nivaldo, Welliton, Leila... A toda equipe desse laboratório que sempre me apoiou e tornou o trabalho menos árduo com a alegria contagiante dessa equipe maravilhosa.

A todos os técnicos do laboratório de bioquímica, aos amigos Marcos e Júlio pela amizade e apoio no trabalho.

A toda amizade construída no curso de produção vegetal, Maria da Penha, Taciana Lopes, Débora, Ervanis, Michelle Justino, Leandro e Bruna, por toda amizade, compreensão e atenção; sem vocês o caminho seria bem mais difícil.

Aos amigos Thiago José, André Ferraz e Eduardo por toda a amizade ao longo da caminhada.

Às amigas Elayne Kodoroff e Amanda do Laboratório de Fisiologia por toda amizade e vivência nos trabalhos árduos.

A todos da equipe de solos: Patrícia, Adriana Bezerra, Emanuela, Wagner, Marlon e Vinicius.

Aos amigos Kellyton e Melyssa Mascarenhas, Ronildo e Emanuel Pantoja, por toda a ajuda com palavras e na torcida durante os momentos difíceis desse trabalho.

Aos amigos Luciano Medeiros, Fabrício Nilo e Lígia por toda a amizade.

À Viviane Felizardo por toda a compreensão, dedicação, aconselhamentos e toda a amizade construída ao final desse trabalho.

Ao CENAPESQ pela disponibilização da infraestrutura que possibilitou os experimentos do presente trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e toda sua equipe de professores por possibilitar essa conquista.

Aos professores da unidade acadêmica de Serra Talhada, Walter e Antônio.

À CAPES pela concessão da bolsa de pesquisa sem a qual não seria possível a realização desse trabalho.

À banca examinadora, pelas valiosas sugestões para a melhoria da Dissertação.

Enfim, o meu muito obrigada e sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram do início ao fim desta árdua jornada.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende (Leonardo da Vinci).

Tudo tem o seu tempo determinado,
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.

Há tempo de nascer,
e tempo de morrer;
tempo de plantar,
e tempo de arrancar o que se plantou;

Tempo de matar,
e tempo de curar;
tempo de derrubar,
e tempo de edificar;

Tempo de chorar,
e tempo de rir;
tempo de prantear,
e tempo de dançar;

Tempo de espalhar pedras,
e tempo de ajuntar pedras;
tempo de abraçar,
e tempo de afastar-se de abraçar;

Tempo de buscar,
e tempo de perder;
tempo de guardar,
e tempo de lançar fora;

Tempo de rasgar,
e tempo de coser;
tempo de estar calado,

e tempo de falar;

Tempo de amar,
e tempo de odiar;
tempo de guerra,
e tempo de paz.

Eclesiastes 3:1-8

RESUMO GERAL

A utilização de produtos químicos no controle de patógenos de plantas tem causado muitos efeitos prejudiciais ao ambiente. O bioprotetor e a quitosana, tanto a obtida por meio do fungo *Cunninghamella elegans* como a obtida de crustáceos, vem sendo utilizados como agentes alternativos no controle de patógeno em plantas, além disso, a quitosana proporciona efeitos positivos para a nutrição de plantas, fertilização do solo e na absorção de nutrientes pelas plantas. A quitosana atua no aumento da tolerância de plantas a estresses e na ativação de respostas de defesa, de forma a se tornarem mais resistentes contra micro-organismos fitopatogênicos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da quitosana de crustáceo e do bioprotetor na defesa de *Sclerotium rolfsii* e no estado nutricional de feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo que em ambos utilizou-se 11 tratamentos (1) tratamento controle: fertilizante solúvel (FNPK) sem quitosana; (2) protetor (PNPK) 50% da dose recomendada; (3) PNPK 100%; (4) PNPK 150%; (5) húmus de minhoca (HM); (6) HM + quitosana 2 mg/mL; (7) HM + quitosana 4 mg/mL; (8) HM + quitosana 6 mg/mL; (9) biofertilizante misto 150%; (10) testemunha 1: solo sem patógeno; (11) testemunha 2: solo com patógeno. No primeiro capítulo, realizou-se um ensaio *in vitro* para verificar a ação das diferentes concentrações de quitosana (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/mL) no controle do patógeno, em seguida as concentrações mais promissoras (2, 4 e 6 mg/mL) foram utilizadas na pulverização em folhas de feijão-caupi, em casa de vegetação nos tratamentos 6, 7 e 8. Para a obtenção das plantas de feijão a semeadura foi realizada em vasos, contendo solo autoclavado e não autoclavado. Após 48 horas da pulverização foi realizada a inoculação no colo das plantas em todos os tratamentos, exceto o tratamento 10. No primeiro capítulo foram realizadas as seguintes análises: severidade da doença; teor de proteína solúvel; atividades das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e da catalase (CAT), já no capítulo 2 analisou-se: matéria seca da parte aérea, análise química da planta (N, P e K) e do solo (N, P, K, Mg e Ca). Em relação aos resultados do capítulo 1, conclui-se que os tratamentos com PNPK 50%, 100% e 150%, HM + quitosana 2, 4 e 6 mg/mL e o tratamento FNPK são mais eficazes no controle da severidade da doença. Na análise da proteína solúvel, a utilização de biofertilizante misto, HM + Q 4mg/mL, HM + Q 6mg/mL e FNPK apresentam teores mais elevados na planta. Já na atividade da catalase, os tratamentos que incrementaram as concentrações da mesma são HM + Q

2mg/mL e PNPK 150%; e na atividade da ascorbato peroxidase, a utilização de HM + Q 6mg/mL foi a que teve maior produção dessa enzima na planta. Quanto aos resultados do capítulo 2, pode-se perceber que os tratamentos BNPK, PNPK 150% e húmus de minhoca contendo as diferentes concentrações de quitosana expressam os melhores resultados para as análises de nutrientes realizadas, com valores iguais ou superiores ao tratamento que utilizou o fertilizante convencional (FNPK) e sempre superiores às testemunhas 1 e 2. Diante dos resultados obtidos, pode-se sugerir que a aplicação de bioprotetor, biofertilizante e húmus de minhoca contendo diferentes concentrações de quitosana no feijão-caupi atuam no mecanismo de defesa do feijão-caupi, além de promover maior disponibilidade de nutrientes no solo e na planta. Assim, o bioprotetor, húmus de minhoca e a quitosana aplicados via foliar são uma alternativa viável com grande potencial em substituição aos fertilizantes solúveis convencionais.

Palavras-chave: Feijão-caupi, fertilizante alternativo, murcha do esclerócio.

ABSTRACT

The use of chemicals in the control of plant pathogens has caused many detrimental effects on the environment. The bioprotector and chitosan, both obtained by the fungus *Cunninghamella elegans* and that obtained from crustaceans, have been used as alternative agents in the control of pathogens in plants, in addition, chitosan provides positive effects for plant nutrition, soil fertilization, and nutrient uptake by plants. Chitosan acts to increase plant tolerance to stress and to activate defense responses in order to become more resistant against phytopathogenic microorganisms. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of crustacean chitosan and bioprotect in the defense of *Sclerotium rolfsii* and in the nutritional state of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. The present work was divided in two chapters, in which 11 treatments (1) control treatment were used: soluble fertilizer (FNPK) without chitosan; (2) Protector (PNPK) 50% of the recommended dose; (3) PNPK 100%; (4) PNPK 150%; (5) worm humus (HM); (6) HM + chitosan 2 mg / mL; (7) HM + chitosan 4 mg / mL; (8) HM + chitosan 6 mg / mL; (9) mixed biofertilizer 150%; (10) control 1: soil without pathogen; (11) control 2: soil with pathogen. In the first chapter, an in vitro assay was performed to verify the action of different chitosan concentrations (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0 and 6.0 mg / mL) in the control of the pathogen, Then the most promising concentrations (2, 4 and 6 mg / mL) were used in spraying on cowpea leaves, in greenhouse treatments 6, 7 and 8. To obtain the bean plants, sowing was carried out in pots, containing autoclaved soil and not autoclaved. After 48 hours of spraying, inoculation was performed on the lap of the plants in all treatments, except treatment 10. In the first chapter the following analyzes were carried out: disease severity; Soluble protein content; Activities of the enzymes ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), and in Chapter 2 were (N, P and K) and soil (N, P, K, Mg and Ca). In relation to the results of chapter 1, it was concluded that treatments with PNPK 50%, 100% and 150%, HM + chitosan 2, 4 and 6 mg / mL and FNPK treatment are more effective in controlling the severity of the disease. In the analysis of the soluble protein, the use of mixed biofertilizer, HM + Q 4mg / mL, HM + Q 6mg / mL and FNPK presented higher levels in the plant. In the catalase activity, the treatments that increased its concentrations are HM + Q 2mg / mL and PNPK 150%; And in the activity of ascorbate peroxidase, the use of HM + Q 6mg / mL was and what activates greater production of this enzyme in the plant. As regards the results of chapter 2, it can be seen that the

treatments BNPK, PNPK 150% and earthworm humus containing the different concentrations of chitosan express the best results for nutrient analyzes performed, with values equal to or higher than the treatment that used the Conventional fertilizer (FNPK) and always higher than control 1 and 2. In view of the obtained results, it can be suggested that the application of bioprotector, biofertilizer and earthworm humus containing different concentrations of chitosan in the cowpea act on the cowpea defense mechanism, besides promoting greater availability of nutrients in the soil and in the plant. Thus, the bioprotector, earthworm humus and chitosan applied via the leaf are a viable alternative with great potential to substitute conventional fertilizers.

Key words: Cowpea beans, alternative fertilizer, wilt of sclerotia.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Curva de crescimento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> utilizando diferentes concentrações de quitosana ao longo do tempo (7, 14, 28 e 35 dias).....	35
Figura 2. Estágios avaliados do Índice de severidade da murcha do esclerócio em caupi.....	37

CAPÍTULO 2

Figura 1. Esquema simplificado da produção do biofertilizante (NPKB) e bioprotetor (NPKP). Os sulcos cobertos com plástico preto em campo são mostrados em (a)	56
Figura 2 Matéria seca da parte aérea do feijão-caupi (g/vaso) coletada 50 dias após a germinação no solo não autoclavado e autoclavado. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, para solo não autoclavado e minúsculas iguais para solo autoclavado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). FNPK: fertilizante convencional; PNPk: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; CV: coeficiente de variação.....	63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Índice de severidade da doença murcha do <i>Sclerotium</i> (%) em caupi inoculado com <i>S. rolfsii</i> e avaliado 50 dias após a germinação em solo não autoclavado e solo autoclavado.	38
Tabela 2: Proteína solúvel mg/g de matéria fresca em folhas de feijão-caupi coletas no 14° (1° coleta) e 28° (2° coleta) dias após a inoculação do patógeno em solo não autoclavado e solo autoclavado	39
Tabela 3: Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg.Proteína/min}$) em folhas de feijão-caupi; coletas no 14° (1° coleta) e 28° (2° coleta) dias após a inoculação do patógeno no solo não autoclavado e solo autoclavado.....	41
Tabela 4: Atividade da Ascorbato Peroxidase ($\mu\text{mol AsA/g.Proteína /min}$) em folhas de feijão-caupi coletas no 14° (1° coleta) e 28° (2° coleta) dias após a inoculação do patógeno no solo não autoclavado e solo autoclavado	43

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Características químicas e físicas do Latossolo Vermelho Amarelo (Paudalho, PE).	55
Tabela 2: Nitrogênio N (mg kg^{-1}), fósforo P (mg kg^{-1}) e potássio K (mg kg^{-1}) acumulados na parte aérea de plantas do feijão-caupi, coletada 50 dias após a germinação no solo não autoclavado e solo autoclavado.	64
Tabela 3: pH (1,0:2,5) no solo após 50 dias de cultivo do feijão-caupi no solo não autoclavado e solo autoclavado	67
Tabela 4: Nitrogênio total no solo (mg/g), fósforo disponível (mg/dm^3), cálcio, magnésio e potássio trocáveis), após 50 dias de cultivo do caupi no experimento com solo autoclavado.	70
Tabela 5: Nitrogênio total no solo (mg/g), fósforo disponível (mg/dm^3), cálcio, magnésio e potássio trocáveis), após 50 dias de cultivo do caupi no experimento com solo não autoclavado	72

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	17
CAPÍTULO 1: EFEITO DA QUITOSANA E DO BIOPROTETOR NO CONTROLE DE <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. EM FEIJÃO-CAUPI.....	19
RESUMO	19
ABSTRACT	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Obtenção dos isolados de <i>Sclerotium rolfsii</i> , agente causal da murcha do <i>Sclerotium</i>	24
2.2 Metodologia do teste “in vitro”	24
2.2.1 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial de <i>S. rolfsii</i>	24
2.3 Delineamento experimental do ensaio “in vitro”	25
2.4 Experimento em casa de vegetação	26
2.5 Produção do biofertilizante misto (BNPK) e do bioprotetor (PNPK)	26
2.6 Delineamento experimental.....	27
2.7 Solo utilizado.....	27
2.8 Obtenção e preparo das sementes	28
2.9 Obtenção e preparo do gel de quitosana	28
2.10 Pulverização da quitosana	29
2.11 Severidade da murcha de <i>S. rolfsii</i>	29
2.12 Análises enzimáticas.....	30
2.13 Obtenção do tecido foliar	30
2.14 Determinação de proteína solúvel e atividade enzimática	30
2.15 Teor de Proteína Solúvel	30
2.16 Determinação da Atividade da Catalase (CAT)	31
2.17 Ascorbato peroxidase (APX).....	32
2.18 Análise estatística	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
3.1 3.1 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial de <i>Sclerotium rolfsii</i> ..	33
3.2 Experimento em Casa de Vegetação	35
3.2.1 Análise da Severidade da Murcha do <i>Sclerotium in situ</i>	35
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	45
5 REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 2: EFEITO DO BIOPROTETOR COM <i>Cunninghamella elegans</i> E DA QUITOSANA DE CRUSTÁCEO NO ESTADO NUTRICIONAL DO FEIJÃO-CAUPI [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp] E NA DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES NO SOLO.....	51
RESUMO	51
ABSTRACT	52
1. INTRODUÇÃO	53
2. MATERIAL E MÉTODOS	55
2.1 Local do experimento e solo utilizado.....	55

2.2	Biofertilizante misto (BNPK), bioprotetor (PNPK) e fertilizante solúvel (FNPK).....	55
2.3	Delineamento Experimental	57
2.4	Condução dos experimentos.....	57
2.5	Obtenção e preparo das sementes.....	58
2.6	Obtenção e preparo do gel de quitosana.....	58
2.7	Pulverização da quitosana	59
2.8	Obtenção e inoculação do patógeno	59
2.9	Matéria seca da parte aérea.....	59
2.10	Análises químicas na planta	59
2.11	Análises químicas do solo	60
2.12	Análises Estatísticas	60
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
3.1	Matéria seca da parte aérea.....	61
3.2	Análises químicas das plantas	63
3.3	Análise químicas no solo.....	66
3.3.1	Análise de pH.....	66
3.3.2	Solo autoclavado.....	68
3.3.3	Solo não autoclavado	71
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
5.	REFERÊNCIAS	76

APRESENTAÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma cultura de grande importância socioeconômica para o Brasil, constituindo-se em um componente alimentar básico devido ao alto valor nutricional para as populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, além de gerar emprego e renda para as mesmas. Porém sua produtividade pode ser afetada por doenças oriundas de fungos, dentre as quais se encontra o *Sclerotium rolfsii* Sacc que é o agente causador da podridão ou murcha do esclerócio, ocasionando redução em mais de 50% na produção de grãos em plantas acometidas pela doença.

O cultivo dessa leguminosa exige o uso de fertilizantes e corretivos, objetivando o aumento da produtividade das culturas de alimentos, de modo a atender critérios econômicos e ao mesmo tempo a conservação e a fertilidade do solo. A fertilização é um fator muito importante que afeta a produtividade e a disponibilidade de nutrientes no solo, podendo promover aumento no rendimento das plantas e melhorar o sistema de culturas agrícolas.

Estudos que visem à descoberta de biofertilizantes alternativos em substituição ao uso de fertilizantes e insumos agrícolas convencionais (fertilizantes minerais solúveis) atualmente utilizados são necessários para que haja uma agricultura sustentável. Os fertilizantes convencionais, além de onerosos, são agressivos ao ambiente. Também vale salientar que o alto custo dos fertilizantes solúveis contribui diretamente para redução de sua aplicação, particularmente por agricultores de baixa renda.

Os biofertilizantes produzidos a partir de rochas PK com *Acidithiobacillus* mais matéria orgânica (composto de minhoca) enriquecido em N por bactérias diazotróficas de vida livre e fungos que produzem quitosana (*Cunninghamella elegans* Lendner), podem ser aplicados como alternativa aos fertilizantes convencionais (FNPK).

A quitosana tem sido amplamente estudada, visto que a sua utilização pode atuar em diferentes respostas incluindo lignificação, variações no fluxo iônico, acidificação citoplasmática, despolarização da membrana e fosforilação de proteína, ativação da quitinase e da glucanase, biossíntese da fitoalexina e do ácido jasmônico, geração de espécies reativas de oxigênio, expressão de genes únicos de resposta precoce e relacionados à defesa, indução à formação de calose e inibição de proteinase em muitas espécies.

Desse modo, é importante testar a utilização da quitosana e do bioprotetor em plantas de feijão-caupi, para verificar sua atuação na defesa da planta contra patógenos e também na nutrição da planta e presença de nutrientes do solo, afim de que possam ser indicados como protetores e fertilizantes alternativos à utilização dos convencionais já utilizados.

CAPÍTULO 1: EFEITO DA QUITOSANA E DO BIOPROTETOR NO CONTROLE DE *Sclerotium rolfsii* Sacc. EM FEIJÃO-CAUPI.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da quitosana de crustáceo e do bioprotetor no mecanismo de defesa de *Sclerotium rolfsii* em *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Utilizou-se 11 tratamentos: (1) tratamento controle: fertilizante solúvel (FNPK) sem quitosana; (2) protetor (PNPK) 50% da dose recomendada; (3) PNPK 100%; (4) PNPK 150%; (5) húmus de minhoca (HM); (6) HM + quitosana 2 mg/mL; (7) HM + quitosana 4 mg/mL; (8) HM + quitosana 6 mg/mL; (9) biofertilizante misto 150%; (10) testemunha 1; (11) testemunha 2. Realizou-se um ensaio *in vitro* para verificar a ação das diferentes concentrações de quitosana de crustáceo (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 e 6,0 mg/mL) no controle do patógeno, em seguida as concentrações mais promissoras (2, 4 e 6 mg/mL) foram utilizadas na pulverização em folhas de feijão-caupi, em casa de vegetação nos tratamentos 6, 7 e 8. Para a obtenção das plantas de feijão a semeadura foi realizada em vasos, contendo solo autoclavado e não autoclavado. Após 48 horas da pulverização foi realizada a inoculação no colo das plantas em todos os tratamentos, exceto o tratamento 10. Foram realizadas as seguintes análises: severidade da doença; teor de proteína solúvel; atividades das enzimas ascorbato peroxidase (APX) e da catalase (CAT). Na análise da proteína solúvel, a utilização de biofertilizante misto, HM + Q 6mg/mL e FNPK foram os que apresentaram melhores resultados. Na atividade da catalase, os tratamentos que obtiveram melhor resposta foram HM + Q 2mg/mL e PNPK 150%; já na atividade da ascorbato peroxidase a utilização de HM+Q 6mg/mL foi o que apresentou maior atividade dessa enzima. Como conclusão, pode-se sugerir que a aplicação de bioprotetor e de húmus de minhoca, contendo diferentes concentrações de quitosana no feijão-caupi pode atuar no mecanismo de defesa dessa planta mediante aumento da proteína solúvel e das atividades enzimáticas da catalase e da ascorbato peroxidase.

Palavras-chave: Controle alternativo, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, murcha do esclerócio.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of crustacean chitosan in the control of *Sclerotium rolfsii* Sacc. In cowpea. An in vitro mycelial growth control assay of the pathogen with chitosan was performed when concentrations of 2, 4 and 6 mg / mL were evaluated. From the greenhouse test using autoclaved and non-autoclaved soils, the following analyzes were performed: disease severity; Soluble protein content; Activities of the enzymes ascorbate peroxidase (APX) catalase (CAT). It was used a DIC with 11 treatments and three replicates, all with the application of the pathogen, except the control (treatment 10): (1) soluble fertilizer (FNPK) without chitosan; (2) Protector (PNPK) 50% of the recommended dose; (3) PNPK 100%; (4) PNPK 150%; (5) worm humus (HM); (6) HM + chitosan 2 mg / mL; (7) HM + chitosan 4 mg / mL; (8) HM + chitosan 6 mg / mL; (9) mixed biofertilizer 150%; (10) soil of Zona da Mata without pathogen; (11) soil of the Zona da Mata. Treatments with PNPK 50%, 100% and 150%, HM + chitosan 2, 4 and 6 mg / mL showed the lowest disease severity indexes. In the analysis of the soluble protein, the use of mixed biofertilizer, HM + Q 4mg / mL, HM + Q 6mg / mL and FNPK were the ones that presented better results. In the catalase activity, the treatments that obtained the best response were HM + Q 2mg / mL and PNPK 150%; Already in the activity of ascorbate peroxidase the use of HM + Q 6mg / mL was the one that presented greater activity of this enzyme. As a conclusion, it can be suggested that the application of bioprotect and earthworm humus, containing different concentrations of chitosan in cowpea can act in the defense mechanism of this plant by increasing the soluble protein and the enzymatic activities of catalase and ascorbate peroxidase.

Key words: Alternative control, *Vigna unguiculata* (L.) Walp, wilt of sclerotia.

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], comumente chamado de feijão de corda, feijão macassar ou feijão fradinho, tem grande importância socioeconômica para o Brasil, constituindo-se em um componente alimentar básico devido ao alto valor nutricional para as populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, além de gerar emprego e renda para as mesmas. O feijão-caupi possui alta adaptabilidade às condições edafoclimáticas do semiárido nordestino, sendo uma das mais importantes leguminosas de grãos, representando uma das principais fontes de proteínas para as populações de baixa renda (FREIRE FILHO et al., 2011).

No entanto, a produtividade do feijão-caupi é afetada por doenças causadas por patógenos, dentre os quais os fungos, caracterizados por apresentar uma ampla diversidade de espécies patogênicas que estão presentes em diversos habitats e colonizam várias partes vegetais do feijoeiro (ATHAYDE SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2005).

Dentre as espécies fúngicas que causam doenças em feijão-caupi, *Sclerotium rolfsii* Sacc. é citado como um importante patógeno habitante do solo nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas no mundo. Este fungo ataca mais de 500 espécies de plantas, incluindo culturas agrícolas e hortícolas de monocotiledôneas e principalmente dicotiledôneas. Este patógeno produz grande número de escleródios que podem permanecer e sobreviver no solo por meses ou anos, dependendo das condições ambientais; contudo, o clima úmido é favorável à germinação dos escleródios e crescimento micelial (XU et al., 2008; SAEED et al., 2016).

Os escleródios são corpúsculos duros e parenquimatosos, formados pelo conjunto de hifas e que permanecem em estado de dormência, até o aparecimento de condições adequadas para sua germinação. Ele germina quando em contato com alta umidade e temperatura amena formando as hifas ou apotécios e, conseqüentemente dos ascósporos (GARCIA; JULIATTI; CASSEMIRO, 2012).

Na cultura do feijão-caupi, *S. rolfsii* é o agente causador da podridão ou murcha do esclerócio (MICHEREFF et al., 2005), ocasionando redução em mais de 50% da produção de grãos em plantas acometidas pela doença (FERY; DUKES, 2011). No estágio inicial da doença, os sintomas observados são geralmente um murchamento completo e amarelecimento das folhas, ocasionados pelos danos no colo da planta hospedeira, causando seca e queda das folhas e consequente morte das plantas (SINGH;

SHARMA; FREIRE FILHO, 2002; SANTOS; TOMAZELI; MORALES, 2009). Os caules das plantas em estágios avançados da doença desenvolvem características que exibem esclerócios de cor clara evoluindo para marrom e crescimento micelial branco na epiderme do caule, na superfície do solo (KARAT; VENUGOPAL; GOULD, 1985).

O controle alternativo e biológico de patógenos é uma opção que pode minimizar os efeitos prejudiciais do uso de agrotóxicos no ambiente, nos alimentos e na indução de resistência dos patógenos que habitam os solos (THAKKAR; SARAFI, 2015). Devido às altas dosagens e quantidade de aplicações em que devem ser utilizados os produtos químicos, a propagação de doenças nos ecossistemas pode dificultar a aplicação bem sucedida desses produtos, fazendo com que alguns pesquisadores concentrem esforços no desenvolvimento de insumos alternativos aos produtos químicos sintéticos para o controle de pragas e doenças (PAL; GARDENER, 2006).

Além disso, a aplicação de compostos químicos eliciadores desencadeiam a ativação de vários genes nas plantas que propiciam a síntese e a acumulação de metabólitos secundários (fitoalexinas e compostos fenólicos), macromoléculas estruturais (calose, lignina e glicoproteína rica em hidroxiprolina), ácidos salicílico e jasmônico, funcionando como sinalizadores para a expressão de proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas-RP), inibidores de enzimas e como enzimas hidrolíticas e do metabolismo secundário (DURRANT; DONG, 2004; JALALI; BHARGAVAS; KAMBLE, 2006; ALAMINO et al., 2013).

Entre os agentes que possuem propriedades antibióticas, antifúngicas e ativadoras de mecanismos de defesa em plantas, encontram-se a quitina e a quitosana (DI PIERO; GARDA, 2008). A quitosana, por ser um produto natural, geralmente de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, tem sido proposta como um material potencialmente atraente para diversas aplicações, principalmente nas áreas de engenharia, biotecnologia, medicina e agricultura (AZEVEDO et al., 2007; DI PIERO; GARDA, 2008). A quitosana atua no aumento da tolerância de plantas a estresses e na ativação de respostas de defesa, de forma a se tornarem mais resistentes contra micro-organismos fitopatogênicos (DI PIERO; GARDA, 2008).

Quando o fitopatógeno ataca as plantas, a quitosana faz com que estas respondam de forma rápida induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HU et al., 2009). O peróxido de hidrogênio é a principal espécie ERO que aciona moléculas para a indução de genes de defesa e a polimerização de proteínas que compõem a parede

celular, além de estimular a produção de enzimas antioxidativas ou de limpeza (ŁUKASIK; GOLAWSKA; WOJCICKA, 2012). No entanto, existe uma variedade de enzimas oxidativas que irão decompor estas espécies reativas de oxigênio, tais como: superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GSH), peroxiredoxina (PRX), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO), entre outras (MITTLER, 2002).

A aplicação de quitosana em plantas tem sido utilizada com a finalidade de desencadear a ativação das enzimas antioxidantes, tais como SOD, CAT e APX, e de enzimas da via do fenilpropanoide, como a fenilalanina amônia-liase (PAL). A biossíntese e o acúmulo dessas enzimas conferem respostas em forma de defesa vegetal, impedindo danos oxidativos (OLIVEIRA; VARANDA; FELIX, 2016a). Dousseau et al. (2016) verificaram que a aplicação da dose correta desse biopolímero em jaborandi pode proporcionar um aumento das atividades enzimáticas da catalase e da peroxidase, enzimas que estão envolvidas na defesa da planta contra o ataque de micro-organismos patogênicos.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica da quitosana presente em crustáceo *in vitro* e *in vivo* e da quitosana fúngica obtida por meio da biomassa micelial do fungo *Cunninghamella elegans in vivo*, componente do bioprotetor utilizado no controle de *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijão-caupi.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Controle Biológico do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA- Recife/PE) e posteriormente em casa de vegetação da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.1 Obtenção dos isolados de *Sclerotium rolfsii*, agente causal da murcha do *Sclerotium*

O patógeno utilizado no experimento foi o fungo *Sclerotium rolfsii*, causador da murcha do *Sclerotium* em caupi. O fungo foi isolado, em laboratório a partir de plantas com sintomas da doença coletadas em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA - Recife). O isolado de *S. rolfsii* foi repicado em placas de Petri contendo meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), mantidas por um período de 15 dias em câmara de germinação tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 28 °C por fotoperíodo de 12 horas.

Para posterior utilização em casa de vegetação, realizou-se a inoculação em plantas de feijão-caupi; as plantas com sintomas foram coletadas e posteriormente partes do colo infectado foram plaqueadas em meio BDA e após 15 dias de incubação, o patógeno foi reisolado e repicado para novas placas contendo BDA; as colônias e estruturas fúngicas repetiram as características da cultura original, completando assim o postulado de Koch e confirmando-se a patogenicidade do fungo.

A inoculação foi realizada conforme metodologia descrita por Dantas et al. (2002), com modificações, utilizando-se um disco de micélio. A inoculação foi realizada ferindo-se levemente o colo de cada planta com estilete flambado em apenas um local e depositando-se apenas um disco de micélio com esclerócios sobre o ferimento. Todas as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas.

2.2 Metodologia do teste “in vitro”

2.2.1 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial de *S. rolfsii*

Para avaliar o efeito da quitosana no crescimento micelial do isolado *S. rolfsii*, foi utilizada a quitosana de crustáceo (Sigma) de médio peso molecular. Para uso experimental, a quitosana foi dissolvida em ácido acético a 1% com pH ajustado para

5,6 com NaOH (1%). O biopolímero foi colocado sob agitação por 24 horas, utilizando-se mesa agitadora para obtenção do gel de quitosana e incorporado ao meio de cultura sintético Batata Dextrose Ágar (BDA) nas concentrações finais de 0, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0 e 6,0 mg/mL (DI PIERO; GARDA, 2008). Para o controle absoluto, utilizaram-se placas de Petri apenas com BDA, e como controle relativo, utilizaram-se placas com o mesmo volume de ácido acético presente nos tratamentos com gel de quitosana.

O gel de quitosana e o meio BDA foram autoclavados separadamente a 120° C por 15 minutos; em seguida combinados e vertidos para placas de Petri. O fungo utilizado no ensaio *in vitro* teve o crescimento acompanhado por 15 dias a 28° C sob luz constante, até a completa formação dos escleródios.

Em seguida, foi adicionado no centro de cada placa um disco de meio de cultura (0,5 cm de diâmetro) com crescimento micelial de *S. rolfsii* com as diferentes concentrações de quitosana, as quais foram mantidas em câmara BOD a 28° C. O diâmetro das colônias foi medido a cada 24 h, até que o crescimento micelial do fungo atingisse as bordas da placa do controle absoluto. Após esse período, observações foram realizadas aos 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a repicagem do fungo. Durante os 35 dias de avaliação do bioensaio foi observado o crescimento micelial quando adicionada a quitosana ao meio de cultura nas concentrações de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0 e 6,0 mg/mL.

2.3 Delineamento experimental do ensaio “*in vitro*”

O ensaio foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado constituído de 8 tratamentos, sendo 6 concentrações de quitosana (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0 e 6,0 mg/mL) mais o controle absoluto (BDA) e controle relativo (BDA + Ácido Acético a 1%), com seis repetições para cada tratamento.

Os dados do crescimento micelial do patógeno (diâmetro da colônia), do controle relativo e absoluto foram submetidos à análise de variância e posterior regressão. Visando avaliar o crescimento da colônia ao longo do tempo, os dados foram plotados em função dos dias de avaliação. Em adição, para melhor visualização do desempenho da quitosana no crescimento do patógeno, o diâmetro da colônia também foi analisado em função das concentrações de quitosana. As análises foram realizadas com auxílio do software SigmaPlot v. 12.5 para Windows, e os resultados considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

2.4 Experimento em casa de vegetação

Os experimentos em casa de vegetação foram realizados no Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE/Recife) durante o período de 03 de junho a 23 de julho de 2016.

2.5 Produção do biofertilizante misto (BNPK) e do bioprotetor (PNPK)

O biofertilizante misto (BNPK) e o bioprotetor (PNPK) utilizados como fonte de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) em casa de vegetação, foram cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

O biofertilizante misto (BNPK) foi produzido seguindo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2016), a partir de rocha fosfatada e de rocha potássica, com adição de enxofre elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans*, que participam como fontes de fósforo, cálcio, potássio e magnésio.

A seguir foi realizada a mistura de matéria orgânica (MO) inoculada com bactéria diazotrófica de vida livre e biofertilizante de rochas (BPK) na proporção 3:1 (MO: BPK). Para enriquecimento em N promovido pelo processo de fixação biológica de N_2 , de acordo com Lima et al. (2010) é necessária a adição de matéria orgânica de rápida degradação, como resíduo de sorvete, resíduos de bebidas, entre outras fontes, para multiplicação da bactéria, visando a produção de biofertilizante misto (BNPK).

A análise do biofertilizante de rocha com fósforo (BP) e com potássio (BK), de acordo com a metodologia da EMBRAPA (2009), forneceu para BP o pH = 3,8; P disponível = 60 g kg^{-1} ; para BK, pH = 3,3; K disponível = $0,5 \text{ g kg}^{-1}$. O biofertilizante misto (BNPK) produzido com húmus de minhoca e resíduo de sorvete, na proporção MO: BPK correspondente a 3:1, mostrou pH = 6,2, N total = $20 \text{ (g kg}^{-1}\text{)}$; P disponível (Mehlich 1) = $15 \text{ (g kg}^{-1}\text{)}$ e K disponível (Mehlich 1) = $10 \text{ (g kg}^{-1}\text{)}$.

Para a produção do bioprotetor (PNPK) ao biofertilizante misto foi adicionado o fungo *Cunninghamella elegans* (Zygomycota) que contém na sua parede celular quitina e quitosana.

2.6 Delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos simultâneos (A e B) para avaliar o efeito da quitosana de crustáceo e da quitosana fúngica de *C. elegans*, componente do bioprotetor no controle de *S. rolf sii* em feijão-caupi. O experimento A foi constituído por solo não autoclavado e o experimento B por solo autoclavado. O solo do experimento B foi esterilizado três vezes num intervalo de 24 horas a 121° C por 60 minutos, e por fim foi procedido um descanso de oito dias para posterior utilização do mesmo em casa de vegetação.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 11 tratamentos, incluindo o controle, com três repetições. Foram avaliados os seguintes tratamentos: (1) fertilizante solúvel convencional (FNPK), sem quitosana + patógeno (tratamento controle); (2) bioprotetor (PNPK) 50 % + patógeno; (3) bioprotetor (PNPK) 100 % da dose recomendada + patógeno; (4) bioprotetor (PNPK) 150% da dose recomendada + patógeno; (5) húmus de minhoca + patógeno; (6) húmus de minhoca + pulverização com quitosana de crustáceo na concentração de 2 mg/mL + patógeno; (7) húmus de minhoca + pulverização com quitosana de crustáceo na concentração de 4 mg/mL + patógeno; (8) húmus de minhoca + pulverização com quitosana de crustáceo na concentração de 6 mg/mL + patógeno; (9) biofertilizante misto 150% da dose recomendada + patógeno; (10) testemunha 1: solo sem patógeno; (11) testemunha 2: solo + patógeno.

Para os vasos com fertilizante mineral solúvel foi preparada uma mistura de superfosfato simples (60% de P_2O_5), sulfato de potássio (50% de K_2O) e sulfato de amônio (20% N). No tratamento controle foram adicionados 30g de húmus de minhoca por vaso (correspondente a 30 t/ha). Os tratamentos foram adicionados na superfície do solo antes da semeadura.

2.7 Solo utilizado

O solo utilizado no experimento foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 2009), coletado na camada de 0 a 20 cm em área localizada no município de Paudalho, Zona da Mata, no estado de Pernambuco. O solo foi seco ao ar, destorroado e passado em peneiras de 2 mm de diâmetro, homogeneizado e adicionado a vasos plásticos com capacidade para 4 litros, sendo acondicionados 4 kg de solo por

vaso. As amostras de solo foram analisadas no Laboratório de Química do Solo do Instituto Agronômico de Pernambuco, apresentando as seguintes características: pH (H₂O) = 6,40; cátions permutáveis (cmolc/dm³) Mg²⁺ = 0,60; Ca²⁺ = 1,70; K⁺ = 0,04; P = 4 mg.dm⁻³.

2.8 Obtenção e preparo das sementes

Sementes da cultivar de feijão-caupi Miranda IPA 207 foram cedidas pelo Programa de Melhoramento de Feijão do Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) para a realização dos bioensaios. Depois de selecionadas, as sementes foram desinfetadas através da exposição a álcool etílico (95%) durante um minuto e submetidas à imersão com hipoclorito de sódio (2%) durante cinco minutos; em seguida houve 10 lavagens sucessivas com água destilada. Posteriormente foi feita a semeadura de sete sementes por vaso, mantendo-se após o desbaste cinco plantas/vaso.

Durante a condução do experimento em casa de vegetação, a umidade foi mantida com adição diária de água destilada, para mantê-la em torno de 80% da retenção máxima. A temperatura oscilou entre 20 e 37° C e a umidade relativa foi 60-80%.

2.9 Obtenção e preparo do gel de quitosana

A quitosana de crustáceo (Sigma-Aldrich Chemical) foi utilizada como agente fungistático ou fungicida em ensaios de laboratório e em casa de vegetação. As concentrações da quitosana utilizadas em casa de vegetação foram previamente testadas em ensaios *in vitro*. A quitosana em casa de vegetação foi testada em adição ao húmus de minhoca em três diferentes concentrações: 2, 4 e 6 mg/mL, determinadas previamente no teste *in vitro*.

O bioprotetor também foi testado como componente antimicrobiano pela adição do fungo *Cunninghamella elegans* ao biofertilizante misto. A espécie *Cunninghamella elegans* (Zygomycota) destaca-se pela potencial utilização no controle biológico por possuir 50% de quitosana em sua parede celular (FRANCO et al., 2004; BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Para aplicação da quitosana foi preparado gel do biopolímero para posterior pulverização nas folhas do caupi. A quitosana foi dissolvida em ácido acético (1%), mantida sob agitação durante 24 horas com pH ajustado para 6,5 (NaOH 1%), obtendo-

se as concentrações finais de 2, 4 e 6 (mg/mL), conforme metodologia descrita por Di Piero e Garda (2008).

2.10 Pulverização da quitosana

A pulverização com quitosana foi realizada sete dias após a germinação e 48 horas antes da inoculação com o patógeno nos dois primeiros pares de folhas, sendo a quantidade determinada de 4 mL/planta; nove dias após a germinação foi realizada a inoculação com *S. rolfsii*. A inoculação foi realizada conforme metodologia descrita no item 2.1.

2.11 Severidade da murcha de *S. rolfsii*

As plantas foram avaliadas quanto à severidade 50 dias após o plantio por meio da observação dos sintomas externos nas plantas e da produção de estruturas do fungo nas plantas e no solo. Para a avaliação utilizou-se uma escala de notas modificada da escala proposta por Schoonhoven e Pastor-Corrales (1987), descrita a seguir:

- Nota 1 - Ausência completa de sintomas e sinais em plantas e no solo;
- Nota 2 - Pequenas lesões necróticas no colo das plantas a partir do ponto de inoculação;
- Nota 3 - Lesões grandes no colo com algum crescimento fúngico; plantas debilitadas e crescimento fúngico no solo ou em restos de cultura sobre o solo;
- Nota 4 - Plantas murchas com lesões em todo o hipocótilo, apresentando crescimento fúngico, com presença de escleródios no colo e no solo, podendo apresentar plantas mortas;
- Nota 5 - Plantas mortas ou com lesões em todo o hipocótilo apresentando crescimento fúngico no solo e no colo das plantas, em toda a extensão de domínio da área da cova ou do vaso onde estão as plantas.

2.12 Análises enzimáticas

As análises enzimáticas da Catalase (CAT) e da Ascorbato Peroxidase (APX) foram realizadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

2.13 Obtenção do tecido foliar

Foram realizadas duas coletas de folhas no 14º e 28º dias após a inoculação do patógeno. O procedimento foi realizado com o auxílio de uma tesoura, sendo escolhida a 3ª folha expandida de uma planta/vaso em cada tratamento, coletando-se apenas os fragmentos da região mediana do limbo foliar e imediatamente acondicionando-os em papel alumínio, colocados em garrafa térmica com nitrogênio líquido e posteriormente em isopor com gelo, a fim de serem armazenados em ultrafreezer a -80° C até o momento do preparo dos extratos (ANDRADE et al., 2013).

2.14 Determinação de proteína solúvel e atividade enzimática

Para preparação do extrato enzimático, foi utilizado 0,2 g de massa fresca das folhas de cada tratamento e de suas respectivas repetições, maceradas em almofariz com nitrogênio líquido, acrescentando 2 mL do tampão fosfato, 50 mg de polivinilpirrolidona (PVP-antioxidante); em seguida, o concentrado foi filtrado e transferido para tubos de *ependorf* de 2 mL. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm a 4° C, e logo após o sobrenadante foi coletado com auxílio de pipeta, transferido para *ependorf* e armazenado a -80° C para avaliar as atividades da catalase, ascorbato peroxidase e proteína solúvel (ANDRADE et al., 2013).

2.15 Teor de Proteína Solúvel

A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (*Bovine Serum Albumin*) como padrão. Para esta determinação foi utilizada a solução estoque de proteína e a solução de *Coomassie Brilliant Blue* (0,01 g de *coomassie* dissolvido em 5 mL de etanol a 95% e adicionados

10 mL de ácido fosfórico concentrado e 85 mL de água bidestilada); posteriormente a solução foi misturada, filtrada e conservada em frasco escuro.

Para o preparo da solução estoque de proteína foi pesado 0,1 g de albumina de soro bovino BSA (PA), dissolvido em água desmineralizada, completando-se seu volume para 100 mL. Em seguida, pipetado para tubos de ensaio, separadamente, 1, 2, 4 e 10 mL da solução de BSA (1 mg/mL) e completado o volume para 20 mL com água bidestilada, o que proporcionou as soluções nas concentrações de 50, 100, 200, 500 e 900 µg/mL.

Para a determinação de proteínas solúveis foram utilizados 100 µL das soluções padrões e dos extratos das amostras; foram acrescentados 2 mL do reagente *Coomassie Brilliant Blue*, agitada suavemente e deixada agir por cinco minutos. As leituras das amostras correspondentes aos extratos enzimáticos foram convertidas em concentração de proteína solúvel para comparação com as leituras de soluções padrões de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0, 50, 100, 200, 500 e 900 mg/L.

2.16 Determinação da Atividade da Catalase (CAT)

A determinação da atividade da CAT foi realizada de acordo com Berris e Sizer (1952). Antes da leitura foram preparadas as soluções de tampão fosfato de potássio monobásico (0,1 M), solução de EDTA a 0,001 M e solução de peróxido de hidrogênio a 0,5 M. Para o preparo da solução tampão foi pesada uma amostra de 4,0827 g de fosfato de potássio e dissolvida em 150 mL de água bidestilada e adicionado 30 µL de EDTA (0,001 M); o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH e HCl e o volume completado para 300 mL. A solução de peróxido de hidrogênio a 0,5 M foi preparada utilizando-se 0,984 mL de peróxido para um balão de 25 mL, e em seguida o volume foi completado com tampão fosfato de potássio (0,1 M).

O extrato de proteínas solúveis foi utilizado durante as leituras. Antes da leitura das amostras, o branco foi preparado utilizando 1390 µL de tampão + 50 µL de tampão fosfato de potássio monobásico (equivalente ao volume da amostra) + 60 µL de peróxido e a leitura foi realizada no espectrofotômetro, em cubetas de quartzo, a 240 nm. Após a leitura do branco, o espectrofotômetro foi zerado e as leituras das amostras foram iniciadas (1390 µL de tampão + 50 µL do extrato de cada amostra + 60 µL de peróxido) no mesmo comprimento de onda utilizado para o branco.

2.17 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Nakano e Asada (1981), usando EDTA (1 mM), peróxido de hidrogênio 100 mM, e ácido ascórbico (10 mM), dissolvido em solução tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0). Antes da leitura das amostras o branco foi preparado utilizando-se 1335 µL de tampão + 75 µL de tampão (equivalente ao volume da amostra) + 75 µL de ascorbato + 15µL de peróxido de hidrogênio; a leitura foi realizada no espectrofotômetro, em cubetas de quartzo (290 nm). Após a leitura do branco o espectrofotômetro foi zerado e as leituras das amostras foram iniciadas, utilizando-se: 1335µL de tampão, 75 µL do extrato enzimático, 75µL de ascorbato e 15µL de peróxido de hidrogênio. As leituras em espectrofotômetro foram realizadas a 290 nm, no tempo 0 e após 60 segundos.

2.18 Análise estatística

Os dados obtidos nos dois experimentos em casa de vegetação foram analisados pelo programa estatístico Sisvar versão 5.3, sendo realizada a ANOVA e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 3.1 Efeito da quitosana sobre o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii*

Numa análise conjunta do crescimento micelial do fungo *Sclerotium rolfsii* nas diferentes concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0 e 6,0 mg/mL) de quitosana ao longo do período (7, 14, 28 e 35 dias), verificou-se em todas as concentrações testadas que até o 7º dia a quitosana foi eficiente no controle de *Sclerotium rolfsii*, inibindo totalmente o desenvolvimento e crescimento do mesmo (Figura 1). O mesmo comportamento não ocorreu com o grupo controle absoluto e relativo, que apresentaram crescimento do micélio desde o primeiro dia de avaliação, demonstrando dessa forma, a efetividade da quitosana no controle do crescimento do fungo até 7 dias, independente da concentração utilizada.

Esta ação de inibição do crescimento micelial de fungos apresentado pela quitosana também foi relatada por Camili et al. (2007), onde verificaram em experimento *in vitro* que as concentrações de quitosana de 0,5; 1; 1,5 e 2 mg/mL inibiram completamente o crescimento micelial de *Botrytis cinérea* por um período de cinco dias a uma temperatura de 22° C.

Foi observado que o diâmetro da colônia tende a ser dependente da concentração de quitosana utilizada, ou seja, com o aumento da concentração da quitosana, ocorre uma redução do diâmetro até o ponto em que não mais se evidenciou crescimento com a concentração de 6,0 mg.mL⁻¹ (Figura 1). Vale ressaltar também, que a quitosana na concentração de 6,0 mg/mL além de inibir o crescimento micelial ocasionou também a morte da colônia fúngica.

O fato da quitosana ser dependente da concentração empregada, também foi observado por Freddo et al. (2014) em seus estudos com o fungo *Rhizoctonia solani*, onde avaliaram o efeito fungistático de diferentes concentrações de quitosana (0, 0,25, 0,5, 1 e 2%), nos quais constataram a redução do crescimento micelial desse fungo. E verificaram ainda que tal crescimento se reduzia conforme o aumento das concentrações.

A concentração de 6 mg.mL⁻¹, foi a única dose que causou a morte celular do fungo em estudo. Estes resultados estão de acordo com relatos de Alcatara (2011), onde verificou em seu experimento, que quando se tem como alvo um fungo filamentoso,

como no caso deste trabalho, é necessário uma concentração maior de quitosana para obter inibição do crescimento micelial e até mesmo a morte celular.

Berger et al. (2016) estudaram o efeito da quitosana de crustáceo no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum* f sp. *tracheiphilum* em diferentes concentrações, sendo observado que as concentrações de 4, 5 e 6 mg/mL afetaram o crescimento micelial do fungo. Todavia, vale ressaltar, que o comportamento de crescimento do fungo pode apresentar resultados diferenciados, já que o mesmo não possui dados determinísticos por ser tratar de um ser vivo.

O controle absoluto atingiu a borda da placa de Petri de 90 x 90 mm após três dias do crescimento do fungo (Figura 1G). O controle relativo não diferiu estatisticamente da testemunha e atingiu a borda da placa com quatro dias de crescimento (Figura 1G). Portanto, o ácido acético utilizado no controle relativo, no mesmo volume (0,1%) para os outros tratamentos com quitosana, mostrou não influenciar no crescimento micelial de *S. rolfsii*. Resultados semelhantes foram encontrados por Berger (2010), trabalhando com quitosana obtida a partir de crustáceos (Sigma Aldric), quando observou que todas as concentrações utilizadas tiveram efeito fungistático em relação ao controle absoluto e relativo com o mesmo volume de ácido utilizado nos experimentos com quitosana.

Conforme Prapagdee et al. (2007), é possível que o efeito fungistático da quitosana visto neste trabalho tenha ocorrido em virtude da presença de quitina, que é o principal componente ativo, tendo em vista que o mesmo possui a capacidade de causar mudanças de ordem estrutural e morfológica de modo a desorganizar as moléculas das células do fungo.

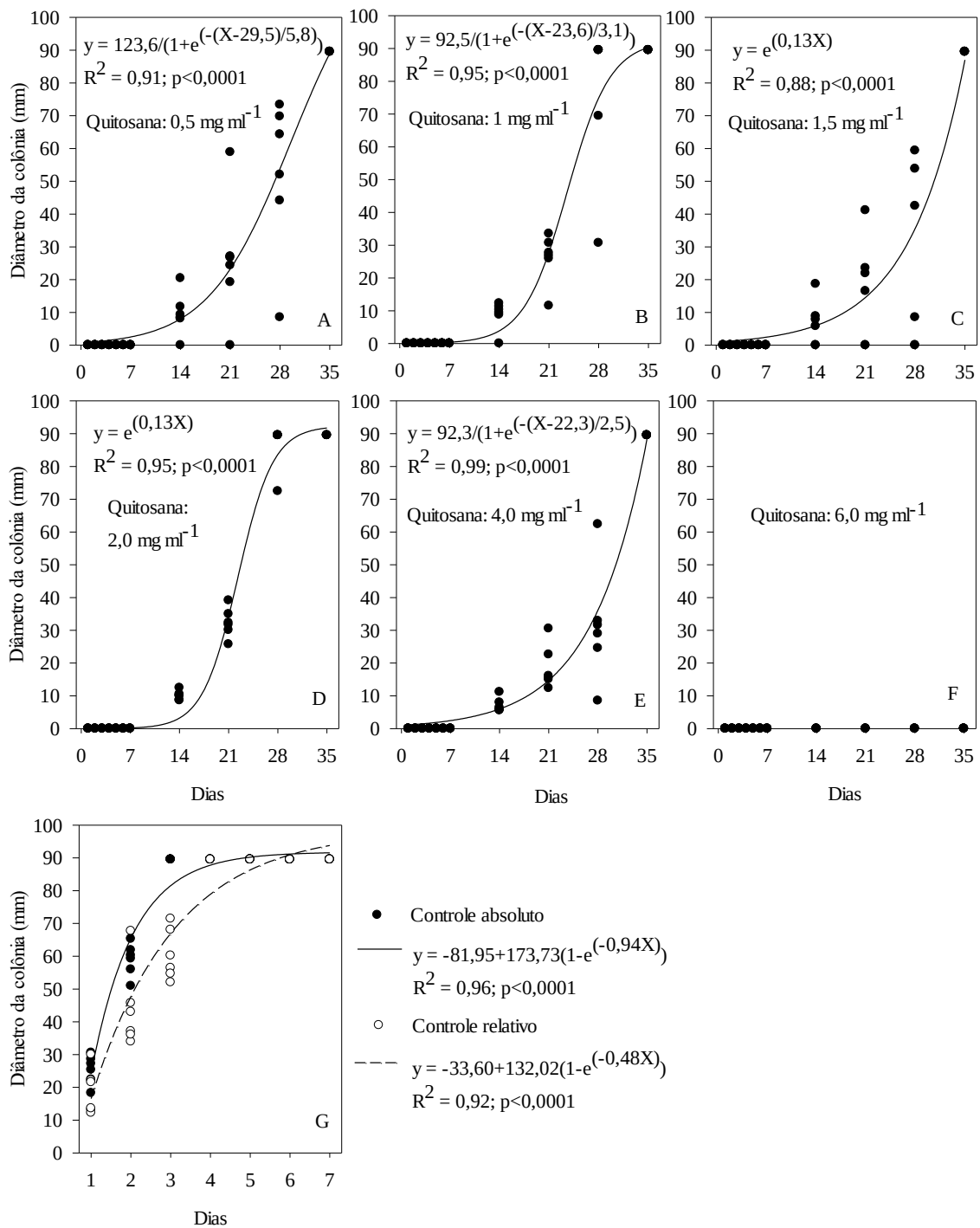


Figura 1. Curva de crescimento micelial de *Sclerotium rolfii* utilizando diferentes concentrações de quitosana ao longo do tempo (7, 14, 28 e 35 dias).

3.2 Experimento em Casa de Vegetação

3.2.1 Análise da Severidade da Murcha do *Sclerotium in situ*

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que os tratamentos com bioprotetor (PNPK) nas doses de 50%, 100% e 150%, húmus de minhoca + quitosana em diferentes concentrações (2, 4 e 6 mg/mL) não diferiram estatisticamente do tratamento controle (testemunha 1) sem o patógeno e apresentaram os menores índices de severidade da doença em solo autoclavado e não autoclavado, apresentando notas variando de 1 a 2,3 (Tabela 1, Figura 2); no entanto, diferiram dos tratamentos que não possuíam quitosana, tais como fertilizante solúvel convencional, húmus de minhoca, biofertilizante misto e testemunha 2, os quais verificou-se maior severidade da doença, sinalizando, assim, sintomas com notas variando de 3,6 a 5 (Tabela 1, Figura 2).

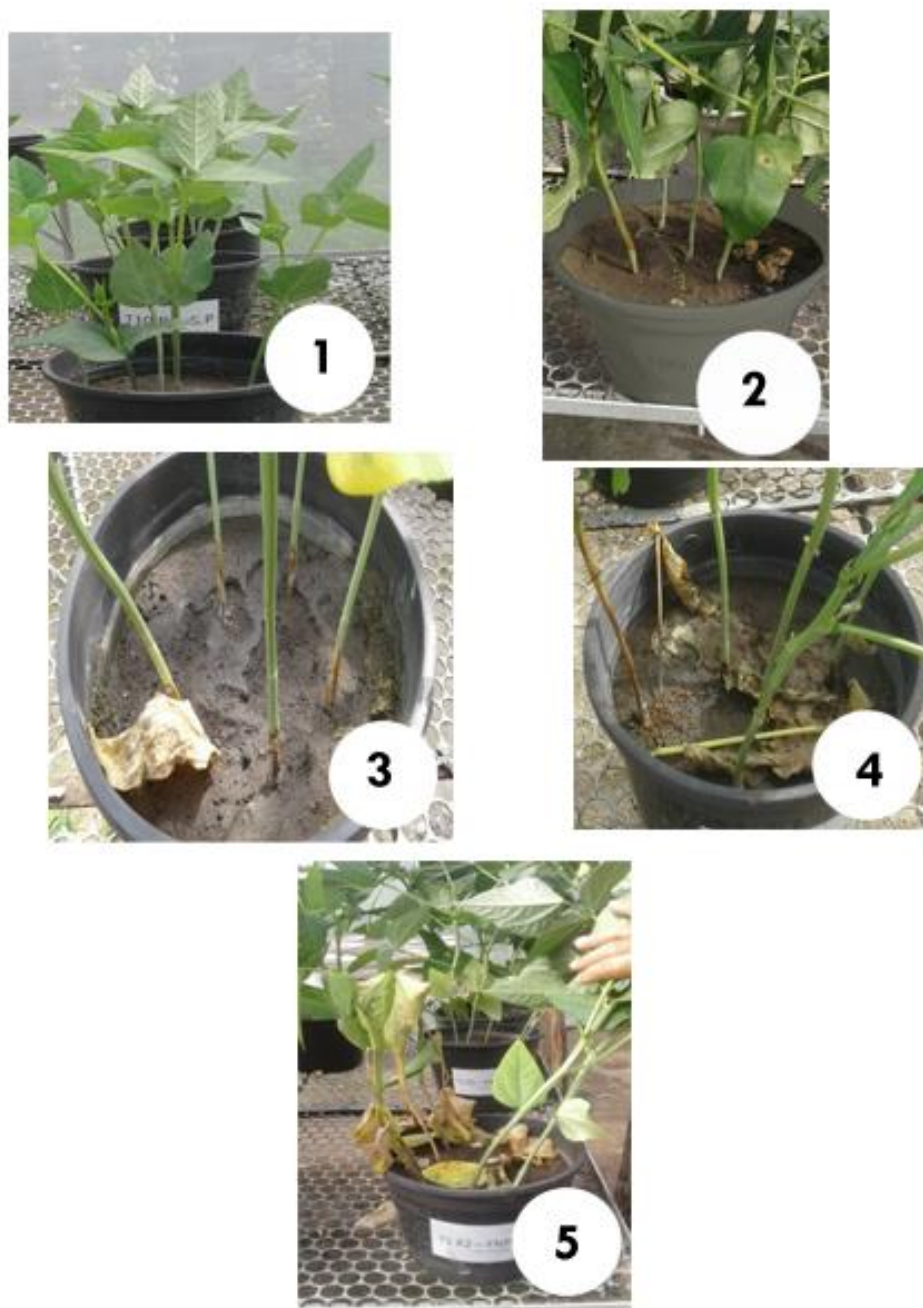


Figura 2. Estágios avaliados do Índice de severidade da murcha do esclerócio em caupi.

Provavelmente a presença de quitosana, componente do bioprotetor, deve ter atuado na proteção contra o patógeno *S. rolfii*, que segundo Stamford (2017) tem atuação comprovada na proteção das plantas contra doenças; a bioproteção das plantas é promovida pela atuação de fungos da ordem Mucorales, especialmente *Cunninghamella elegans* e/ou *Mucor circinelloides*, os quais possuem quitina e quitosana na parede celular.

Di Piero e Garda (2008), ao avaliarem o controle da antracnose em feijoeiro-comum através da utilização de quitosana contra o patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*, constataram que a aplicação desse biopolímero em um intervalo de tempo de quatro dias antes da inoculação mostrou-se mais efetiva na redução da severidade da antracnose e na indução do sistema de defesa da planta. A quitosana promoveu o aumento da atividade da enzima β -1,3-glucanase, a qual atua de forma direta nas glucanas presentes na parede celular do fungo fitopatogênico, inibindo assim o seu desenvolvimento.

Nos estudos de Felipini e Di Piero (2009), a quitosana reduziu a severidade da podridão-amarga em frutos de maçã 'Fuji', imersos na suspensão do polissacarídeo 24 horas depois da inoculação. O efeito da dose também foi relatado por estes autores, visto que a redução foi diretamente proporcional à dose de quitosana e ao tempo em que foi aplicado o agente indutor.

A utilização de bioprotetor, independente da concentração ou da utilização de solo autoclavado ou não, também proporcionou menores índices de severidade da doença da murcha do *Sclerotium* em caupi. De acordo com Thakkar e Sarafi (2015), o biopolímero é utilizado no controle biológico de patógenos, podendo proporcionar um aumento na resistência a patógenos.

Tabela 1: Índice de severidade da doença murcha do *Sclerotium* (%) em caupi inoculado com *S. rolfii* e avaliado 50 dias após a germinação em solo não autoclavado e solo autoclavado.

Tratamentos	Severidade da doença	
	Solo não autoclavado	Solo autoclavado
FNPK + P	4,3 a	4,0 a
PNPK 50% + P	2,3 b	2,3 b
PNPK 100% + P	1,6 b	2,3 b
PNPK 150% + P	1,6 b	2,3 b
HM + P	4,0 a	3,3 a
HM + Q 2mg/mL + P	2,3 b	2,3 b
HM + Q 4mg/mL + P	2,3 b	2,0 b
HM + Q 6mg/mL + P	1,6 b	1,6 b
BM + P	3,6 a	3,6 a
testemunha 1	1,0 b	1,0 b
testemunha 2	5,0 a	4,6 a
CV (%)	26,32	21,41

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

FNPK: fertilizante convencional; PNPK: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

Em relação à presença da proteína solúvel na matéria fresca da folha do feijão-caupi, foi observado que as concentrações aumentaram da primeira coleta para a segunda, o que ocorreu provavelmente por causa do maior tempo de exposição da planta ao tratamento utilizado (Tabela 2).

Na primeira coleta, quando se utilizou o solo não autoclavado, foi observado que os tratamentos HM, HM + Q 2 e 6mg/mL, BM+P, FNPK e testemunha 1 foram os que apresentaram maiores ($P < 0,05\%$) níveis de proteína solúvel em relação à utilização de PNPK independente da concentração e da testemunha 2 (Tabela 2). Por outro lado, foi observado que parece haver um efeito da dose utilizada de PNPK sobre os níveis de proteína, ou seja, quanto maior a dose maior o nível da proteína.

Já quando se utilizou o solo autoclavado, ainda na primeira coleta foi observado que os tratamentos que utilizaram BM + P e o testemunha 1, apresentaram os maiores níveis de proteína solúvel na matéria fresca da folha do feijão-caupi (Tabela 2).

Na segunda coleta foi observado que independente do solo utilizado, as testemunhas apresentaram as menores ($P < 0,05\%$) concentrações de proteína em relação aos demais tratamentos (Tabela 2), demonstrando dessa forma que a adição de PNPK,

FNPK, HM, quitosana ou biofertilizante misto podem proporcionar um aumento nestas concentrações.

Na segunda coleta para o solo não autoclavado, o tratamento com biofertilizante misto foi o que apresentou maiores ($P<0,05$) concentrações de proteínas e a utilização de PNPk independente da concentração utilizada, foi a que apresentou menores ($P<0,05$) concentrações. Já para o solo autoclavado, os tratamentos HM + Q 4mg/mL + patógeno, HM + Q 6mg/mL + patógeno e FNPK, foram os que obtiveram maiores concentrações (Tabela 2).

Tabela 2: Proteína solúvel mg/g de matéria fresca em folhas de feijão-caupi coletas no 14^o (1^o coleta) e 28^o (2^o coleta) dias após a inoculação do patógeno em solo não autoclavado e solo autoclavado

Tratamentos	Solo não autoclavado		Solo autoclavado	
	1 ^a coleta	2 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta
FNPK + P	8,93 a	11,65 b	8,31 b	11,81 a
PNPK 50% + P	6,82 d	11,09 c	7,50 b	10,62 c
PNPK 100% + P	7,31 c	11,21 c	8,31 b	10,82 b
PNPK 150% + P	8,20 b	11,14 c	8,45 b	10,88 b
HM + P	8,64 a	11,01 c	9,05 b	10,32 c
HM + Q 2mg/mL + P	8,70 a	11,63 b	8,75 b	10,50 c
HM + Q 4mg/mL + P	8,23 b	11,42 b	8,67 b	11,39 a
HM + Q 6mg/mL + P	8,60 a	11,52 b	6,38 c	11,79 a
BM + P	8,91 a	12,06 a	9,97 a	11,13 b
testemunha 1	9,15 a	10,36 d	9,80 a	9,48 d
testemunha 2	7,59 c	10,51 d	4,66 d	9,96 d
CV (%)	3,22	2,06	6,99	3,84

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P<0,05$).

FNPK: fertilizante convencional; PNPk: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

De acordo com Graham e Graham (1991), um dos mais eficientes mecanismos de defesa das plantas contra o ataque de patógenos é a reação de hipersensibilidade, onde há a indução da produção de alguns metabólitos secundários como proteínas de defesa codificadas por genes da planta. Essas proteínas podem incluir as estruturais, que trabalham na tentativa de aprisionar o patógeno e as proteínas relacionadas à patogênese (PRP).

As PRP's podem atuar diretamente no patógeno, liberando eliciadores não-específicos que podem desencadear uma resposta de defesa (VAN LOON et al., 2006).

Nesse sentido, a quitosana que é obtida através da desacetilação alcalina da quitina, tem sido caracterizada como sinalizadora na resposta de defesa sistêmica, por mimetizar o fenômeno de reconhecimento que ocorre entre a planta e o patógeno (MEJÍA-TENIENTE et al., 2013).

Além disso, a atuação das PRP's na resistência de plantas contra ataque de patógenos é baseada em atividades hidrolíticas sobre a parede celular, toxicidade direta, permeabilização da membrana plasmática, sinalização no processo de defesa ou inibição, podendo ser direto ou indireto. A defesa de plantas contra a entrada de agentes patogênicos por meio da inibição do crescimento do patógeno ou da germinação de esporos representa uma ação direta. Neste sentido, a atuação das PRP's se dá por meio da atividade antimicrobiana *in vitro*. Isoformas básicas de PRP's geralmente apresentam ação reduzida contra bactérias, insetos, nematóides ou vírus, exercendo maior atividade antifúngica (STANGARLIN et al., 2011).

Em relação à ação indireta, esta opera no processo de indução de resistência, como na prevenção à penetração de patógenos, através da oxidação realizada pelos componentes da parede celular vegetal por meio de peroxidases ou de envolvimento na transdução de sinais durante a interação patógeno-hospedeiro, como na ação de oxalato oxidases e de proteínas relacionadas ao transporte de lipídios (STANGARLIN et al., 2011).

Dentre os tratamentos que continham a quitosana, foi observado na primeira coleta, independentemente do solo utilizado, que o tratamento HM + Q 2mg/mL + P apresentou uma maior atividade da catalase. Já na segunda coleta do solo autoclavado, o tratamento PNPK 150% foi o que apresentou maior atividade dessa enzima.

Estes resultados sugerem que a concentração de quitosana utilizada pode refletir no aumento da atividade da catalase. Dousseau et al. (2016) também verificaram um efeito da concentração de quitosana utilizada sobre a atividade da catalase em jaborandi (*P. mollicomum*), utilizando as concentrações 2,5, 5 e 10 gL⁻¹, onde encontraram um melhor resultado na concentração de 5 gL⁻¹. A determinação da concentração que irá proporcionar melhor resposta é importante, porque dessa forma pode-se evitar o desperdício de bioprotetor na aplicação.

Tabela 3: Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg.Proteína}/\text{min}$) em folhas de feijão-caupi; coletas no 14^o (1^o coleta) e 28^o (2^o coleta) dias após a inoculação do patógeno no solo não autoclavado e solo autoclavado

Tratamentos	Solo não autoclavado		Solo autoclavado	
	1 ^a coleta	2 ^a coleta	1 ^a coleta	2 ^a coleta
FNPK + P	141,53 b	229,38 a	86,15 d	150,58 b
PNPK 50% + P	111,20 c	227,97 a	137,70 c	173,19 b
PNPK 100% + P	141,51 b	241,77 a	170,19 b	76,58 c
PNPK 150% + P	108,01 c	178,39 b	187,53 b	208,21 a
HM + P	139,47 b	117,70 b	126,16 c	174,50 b
HM + Q 2mg/mL + P	159,92 a	171,37 b	221,95 a	146,86 b
HM + Q 4mg/mL + P	145,02 b	172,57 b	155,10 c	98,34 c
HM + Q 6mg/mL + P	104,79 c	154,01 b	172,36 b	176,01 b
BM + P	120,87 c	139,34 b	140,92 c	87,43 c
testemunha 1	92,87 c	123,62 b	64,34 d	84,12 c
testemunha 2	160,34 a	162,24 b	245,37 a	217,97 a
CV (%)	8,53	15,91	16,55	18,97

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

FNPK: fertilizante convencional; PNPK: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

Foi possível observar na primeira coleta, independente do tipo ou tratamento dado ao solo, e na segunda coleta com solo autoclavado, que a testemunha 1 apresentou uma menor atividade da catalase em relação à testemunha 2, demonstrando dessa forma que a presença do patógeno pode ser capaz de induzir o aumento da atividade dessa enzima como um mecanismo de defesa.

Na primeira coleta, independente do solo utilizado, verificou-se que o tratamento HM + Q 2mg/mL + P e a testemunha 2 apresentaram maior atividade da enzima catalase. Já na segunda coleta do grupo que utilizou solo não autoclavado, notou-se que a maioria dos tratamentos, exceto FNPK, PNPK 50% e PNPK 100%, não apresentaram aumento da atividade desta enzima, sugerindo que os tratamentos nas condições utilizadas não interferiram na resposta da planta frente ao ataque do patógeno.

Para o solo autoclavado, os tratamentos PNPK 150% e a testemunha 2, apresentaram na segunda coleta maior atividade da catalase em relação aos demais tratamentos. Em relação à atividade desta enzima, foi observado também na segunda coleta onde se utilizou o solo não autoclavado que os tratamentos FNPK, PNPK 50% e PNPK 100% foram os que apresentaram maior ($P < 0,05$) atividade dessa enzima. O PNPK contém a quitosana em sua composição, que atua na tolerância de plantas a estresses e na ativação de respostas de defesa (DI PIERO; GARDA, 2008).

Quando ocorre a entrada do patógeno na planta e ela realiza seu reconhecimento, ocasiona o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na célula vegetal como o íon superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SHARMA et al., 2012). Esta indução das EROs também pode ocorrer quando as plantas reconhecem os compostos e eliciadores como a quitosana (LEI et al., 2011); no entanto, as EROs em altas concentrações podem danificar o sistema de membranas, levando à peroxidação lipídica e consequentemente à morte celular; já em baixas concentrações, elas atuam como moléculas sinalizadoras na expressão de genes ligados à defesa (BARBOSA et al., 2014).

A aplicação de quitosana para a indução de metabólitos secundários em plantas tem sido estudada, no entanto ainda não se chegou a um consenso quanto à definição de tratamentos que induzam os compostos de interesse sem que haja dano celular (LEI et al., 2011). Sendo assim, a determinação da concentração de quitosana a ser aplicada é fundamental para que o metabolismo de defesa seja ativado sem que haja a morte celular dessas plantas (DOUSSEAU et al., 2016).

Os demais tratamentos não diferiram ($P>0,05$) das testemunhas 1 e 2, sugerindo que não há uma alteração na atividade da CAT na planta quando utilizados estes tratamentos (Tabela 3).

As catalases são enzimas que convertem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em H_2O e O_2 , sendo que o primeiro composto pode ser diretamente tóxico ao patógeno e está envolvido com o fortalecimento da parede celular, uma vez que essa substância é necessária para a biossíntese de lignina (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003). As plantas possuem várias isoformas de catalase, as quais estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas; são as principais enzimas de detoxificação do H_2O_2 em plantas e podem dismutar diretamente o H_2O_2 ou oxidar substratos (BREUSEGEM et al., 2001).

A atividade da ascorbato peroxidase (APX), conforme foi observado na atividade da catalase, a testemunha 2, teve maior atividade em relação à testemunha 1, que utilizou somente o solo, demonstrando que a presença do patógeno na planta é um estímulo para aumentar a atividade dessa enzima (Tabela 4).

Tabela 4: Atividade da Ascorbato Peroxidase ($\mu\text{mol AsA/g.Proteína /min}$) em folhas de feijão-caupi coletas no 14° (1ª coleta) e 28° (2ª coleta) dias após a inoculação do patógeno no solo não autoclavado e solo autoclavado

Tratamentos	Solo não autoclavado		Solo autoclavado	
	1ª coleta	2ª coleta	1ª coleta	2ª coleta
FNPK + P	2580,09 e	8664,12 c	903,04 d	3218,57 d
PNPK 50% + P	2610,94 e	12206,94 a	1829,53 c	6934,25 c
PNPK 100% + P	2365,25 e	6240,48 d	5481,57 a	11496,75 a
PNPK 150% + P	2869,39 e	8895,80 c	1283,27 c	2265,69 d
HM + P	5615,37 b	5727,51 d	5794,85 a	9224,64 c
HM + Q 2mg/mL + P	1682,26 f	5157,82 d	912,04 e	7172,65 c
HM + Q 4mg/mL + P	2236,41 e	6238,27 d	5638,41 a	9449,19 b
HM + Q 6mg/mL + P	7434,13 a	6414,36 d	3772,42 b	6437,59 c
BM + P	4648,66 c	5661,04 d	2435,23 c	8544,37 c
testemunha 1	915,94 g	2730,16 e	927,12 d	1477,04 d
testemunha 2	3408,72 d	11014,82 b	1734,96 c	12663,20 a
CV (%)	10,47	9,35	15,77	21,90

Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

FNPK: fertilizante convencional; PNPk: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

No solo não autoclavado, na primeira coleta, o tratamento HM + Q 6mg/mL + P foi o que apresentou maior atividade da APX, diferindo dos demais tratamentos que utilizaram a quitosana. Para estas mesmas condições, os tratamentos PNPk 50%, PNPk 100%, PNPk 150% não diferiram entre eles, sugerindo que as diferentes concentrações não alteram a atividade dessa enzima. Estes mesmos tratamentos também apresentaram atividade de APX semelhantes aos apresentados pelo tratamento que utilizou FNPK, sugerindo que eles podem ser utilizados como alternativos à utilização de fertilizantes convencionais, quando se deseja o aumento da atividade desta enzima.

Neste trabalho foi observado que a aplicação de diferentes concentrações de quitosana pode afetar a atividade da APX, resultado também obtido por Dousseau et al. (2016) que trabalharam com a aplicação de diferentes concentrações de quitosana (2,5, 5 e 10 gL⁻¹) em jaborandi (*P. mollicomum*), onde observaram que a maior concentração foi a que proporcionou uma maior atividade dessa enzima.

De acordo com Bautista-Banões et al. (2006), a ação da quitosana pode ocorrer por meio da formação de uma barreira estrutural pela lignificação da parede celular ou pelo efeito inibitório sobre o crescimento de fungos fitopatogênicos. Provavelmente a atividade antimicrobiana da quitosana se deve ao grupamento amino em sua forma

policatiônica na presença de pH abaixo de 6, que o torna capaz de interagir com as cargas negativas da membrana celular do patógeno, provocando alterações na permeabilidade da membrana plasmática (PACHECO et al., 2008).

Ainda com a utilização do solo não autoclavado, na segunda coleta foi observado que o tratamento PNPK 50% foi o que apresentou maior atividade da APX em relação aos demais tratamentos. Por outro lado, também foi observado que a adição de quitosa ao húmus de minhoca não alterou a atividade dessa enzima.

A peroxidase é uma das enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário de plantas, responsável por mecanismos que tornam a parede celular mais resistente à penetração do patógeno e à degradação enzimática, contribuindo para reforçar as paredes celulares tanto por interligações de hidroxiprolinas e glicoproteínas ricas em prolina quanto por matriz de polissacarídeos ou ainda aumentando a taxa de formação de lignina por meio da atividade dessa enzima (HAMMOND-KOSACK; JONES, 2000).

Para o solo autoclavado independente da data de coleta, a utilização de PNPK 100% proporcionou uma alta atividade da APX, diferenciando-se dos demais tratamentos que utilizaram este produto em diferentes concentrações. Este resultado sugere que este bioprotetor que contém a quitosana pode ser utilizado nesta concentração para o feijão-caupi como um produto natural no controle de patógenos; além disso, a quitosana é o segundo polímero natural mais abundante no meio ambiente (KATIIYAR; HEMANTARANJAN; SINGH, 2015).

Mudanças na atividade da APX têm sido frequentemente correlacionadas às respostas de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas (STANGARLIN et al., 2011). De acordo com Oliveira et al. (2001) as APX estão diretamente envolvidas no processo de lignificação da parede celular.

Com o solo autoclavado foi observado que os diferentes tratamentos aplicados induziram a uma maior atividade da APX, fato este que pôde ser notado quando se compararam os diferentes tratamentos com a testemunha 1, que utilizou somente o solo sem a utilização de patógenos.

A APX faz parte das enzimas oxidativas que são responsáveis por degradar as espécies reativas de oxigênio. Neste sentido, a quitosana atua fazendo com a planta responda de uma forma mais rápida ao ataque do fitopatógeno, por meio da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), principalmente ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HU et al., 2009).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que:

- A quitosana de crustáceo possui efeito fungicida e fungistático no crescimento micelial de *S. rolfsii* Sacc. *in vitro*.
- O bioprotetor e a quitosana de crustáceo aplicados nas diferentes doses proporcionaram menor severidade da doença.
- A quitosana de crustáceo e do bioprotetor em plantas de feijão-caupi podem atuar na eficiência do mecanismo de defesa dessas plantas, mediante aumento da proteína solúvel e a atividade enzimática da catalase e da ascorbato peroxidase.

5 REFERÊNCIAS

- ALAMINO, D. A. et al. Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 48, n. 3, p. 249-254, mar. 2013.
- ALCATARA, S. R. C. Utilização da quitosana como biocida na agricultura em substituição aos agrotóxicos. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e meio ambiente) – Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2011.
- ANDRADE, C. C. L. et al. Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n.1, p. 28-34. Jan./ Feb. 2013.
- ATHAYDE SOBRINHO C.; VIANA F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças fúngicas e bacterianas. In: ATHAYDE SOBRINHO C. (Ed.). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. p. 463-486.
- AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Chitosan as a potencial natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, Berlin, v. 25, p. 108-118, Feb. 2006.
- BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.
- BEERS JUNIOR, R. F.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, New York, v. 195, p. 133-140, 1952.
- BERGER, L. R. R. **Efeito da quitosana e do biofertilizante-bioprotetor na murcha-de-fusário em caupi** (*Vigna unguiculata* L. Walp. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.
- BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, País Basco, v. 12, n. 4, p. 195-215, Ago. 2011.
- BERGER, L. R. R. et al. Cowpea resistance induced against *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* by crustaceous chitosan and by biomass and chitosan obtained from *Cunninghamella elegans*. **Biological Control** (Print), Logan, v. 92, p. 45-54, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analitical Biochemistry**, v. 722, n. 1-2, p. 248 - 254, May. 1976.

BREUSEGEM, F. V. et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Ireland, v. 161, n. 3, p. 405-414, Aug. 2001.

CAMILI, E. C. et al. Avaliação de quitosana aplicada em pós-colheita, na presença de uva Itália contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathológica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 215-221.

DANTAS, S. A. F. et al. Identificação de fontes de resistência em feijoeiro a *Sclerotium rolfsii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 528-531, 2002.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, set. 2008.

DOUSSEAU, S. et al. Aplicação exógena de quitosana no sistema antioxidante de jaborandi. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 1, p. 191-197, jan. 2016.

DURRANT, W. E.; DONG, X. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, Mar. 2004.

EMBRAPA - EMBRAPA Solos. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, EMBRAPA Solos, 2009. 627p.

FELIPINI R. B.; DI PIERO, R. M. Redução da severidade da podridão-amarga de maçã em pós-colheita pela imersão de frutos em quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 12, p. 1591-1597, Dec. 2009.

FERY, R. L.; DUKES, P. D. Southern blight (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) of cowpea: genetic characterization of two sources of resistance. **International Journal of Agronomy**, Nasr City, v. 6, p. 1-6, 2011.

FRANCO, L. O. et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo. v. 35, n. 3, p. 243-247, July/Sept. 2004.

FREDDO, A. R. et al. A quitosana como fungistático no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 1-4, Jan. 2014.

FREIRE FILHO, F. R. et al. **Feijão – caupi: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2011. 81p.

GARCIA, R. A.; JULIATTI, F. C.; CASSEMIRO, T. A. Produção de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) de Bary em meio de cultura. **Bioscience Journal**. Uberlândia, v. 12, n. 1, p. 1-7, Jan./Feb. 2012.

GRAHAM, T. L.; GRAHAM, M. Y. Cellular coordination of molecular responses in plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Rome, v. 4, p. 415-422, 1991.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Responses to plant pathogens. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: ASPP, 2000. p. 1102-1156.

HU, Z. et al. Effects of feeding *Clostera anachoreta* on hydrogen peroxide accumulation and activities of peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *Populus simonii* x *P. pyramidalis* 'Opera 8277' leaves. **Acta Physiologiae Plantarum**, Beltsville, v. 31, p. 995-1002, 2009.

JALALI, B. L.; BHARGAVA, S.; KAMBLE, A. Signal transduction and transcriptional regulation of plant defense responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.154, n. 2, p. 65-74, Jan. 2006.

KARAT, K. P. R.; VENUGOPAL, R.; GOULD, J. V. Identification of fieldresistance and symptomatology for collar rot of cowpea causedby *Sclerotium rolfsii* under natural conditions. **Plant Pathology**, Malden, v. 3, n. 23, 1985.

KATYAR, D.; HEMANTARANJAN, A.; SINGH, B. Chitosan as a promising natural compound to enhance potential physiological responses in plant: a review. **Indian Journal of Plant Physiology**, Germany, v. 20, n.1, p. 1-9, Feb. 2015.

LEI, C. et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

LIMA, F. S. et al. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1769-1777, Oct. 2010.

ŁUKASIK, I.; GOŁAWSKA, S.; WÓJCICKA, A. Effect of cereal aphid infestation on Epidemiologia de doenças radiculares. In: MAFFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G. (Eds.). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012. p.198-234.

MEJÍA-TENIENTE, L. et al. Oxidative and molecular responses in *Capsicum annuum* L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Switzerland, v. 14, n. 5, p. 10178-10196, 2013.

MICHEREFF, S. J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, S. J. (Ed.). **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. p. 1-18.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Ireland, v. 7, n. 1, p. 405-410, Sep. 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

OLIVEIRA, C. A. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade de cercosporiose em folhas de cafeeiro. In **Anais...** 2º Simpósio dos Cafés do Brasil, Vitória, ES. 2001. p. 80.

OLIVEIRA, M. D. M.; VARANDA, C. M. R.; FÉLIX, M. R. F. Induced resistance during the interaction pathogen x plant and the use of resistance inducers. **Phytochemistry Letters**, Amsterdam, v. 15, p. 152-158, March, 2016.

OLIVEIRA, W. S. et al. The impact of biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan on melon characteristics and nutrient uptake as an alternative for conventional fertilizers. **Journal of Scientia Horticulturae**, v. 209, n. 19, p. 236-240, Sep. 2016.

PACHECO, N. et al. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *Penicillium digitatum*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, n. 1, p. 20-26, 2008.

PAL, K. K.; GARDENER, M. B. Biological Control of Plant Pathogens. **The Plant Health Instructor**, p. 1-25, 2006.

PRAPAGDEE, B. et al., The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. glycines. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1353-1358, May 2007.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

SAEED, S. et al. Biological control of *Sclerotium rolfsii* through the leaf extract of *Melia azedarach* L. and *Syzygium cumini*. **Journal of Medicinal Plants Studies**, v. 4, n. 5, p. 259-261, 2016.

SANTOS, I.; TOMAZELI, V. N.; MORALES, R. G. F. Resíduos orgânicos e solarização para o controle das doenças do feijoeiro causadas por *Sclerotium rolfsii*. In: SANTOS, I.; TOMAZELI, V. N.; MORALES, R. G. F. (Eds.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. cap. 13. p. 209-224.

SCHOONHOVEN, A. V.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Standard system for the evaluation of bean germplasm**. Colômbia: CIAT, 1987. 54 p.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p.1-26, 2012.

SINGH, B. B.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. Recent progress in cowpea breeding. In: SINGH, B. B.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F. R. (Eds.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: ITA, 2002. p. 22-40.

STAMFORD, N. P. et al. Biotecnologia Aplicada à Agroindústria e Alimentos. In: STAMFORD, N. P. (Ed.). **Produção, Propriedades e Aplicações da Quitosana na Agricultura e Alimentos**. 1ª ed. São Paulo: Editora Blucher, 2017. v. 1, p. 503-528.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, Curitiba, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

THAKKAR, A.; SARAFI, M. Development of microbial consortia as a biocontrol agents for effective management of fungal diasease in *Glycine max* L. **Archives of Phytopathology and Protection**, v. 48, n. 6, p. 459- 474, 2015.

VAN LOON, L. C. et al. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, p. 135-62, 2006.

XU, Z. et al. Overwintering of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii* in different latitudes of the United States. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 719-724, 2008.

CAPÍTULO 2: EFEITO DO BIOPROTETOR COM *Cunninghamella elegans* E DA QUITOSANA DE CRUSTÁCEO NO ESTADO NUTRICIONAL DO FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] E NA DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES NO SOLO.

RESUMO

Os biofertilizantes produzidos a partir de rochas PK com *Acidithiobacillus* mais matéria orgânica (composto de minhoca) enriquecido em N por bactérias diazotróficas de vida livre e fungos que produzem quitosana (*Cunninghamella elegans*), podem ser aplicados como alternativa aos fertilizantes convencionais (FNPK). O trabalho visa avaliar o efeito de diferentes fontes de nutrientes para uso alternativo do bioprotetor e da quitosana de crustáceos (comercial) aplicada via foliar na substituição de fertilizantes convencionais com um Latossolo Vermelho Amarelo da Zona da Mata de Pernambuco. Foram realizados dois experimentos simultâneos (A e B) com solo esterilizado e solo não esterilizado em casa de vegetação. O delineamento usado foi o inteiramente casualizado com 11 tratamentos, com três repetições. Os tratamentos foram: (1) fertilizantes solúveis (FNPK) na dose recomendada (DR) + patógeno; (2) bioprotetor (PNPK) 50% DR + patógeno; (3) PNPK 100% DR + patógeno; (4) PNPK 150% DR + patógeno; (5) húmus de minhoca (HM) + patógeno; (6) húmus de minhoca + quitosana (2mg/mL) + patógeno; (7) húmus de minhoca + quitosana (4mg/mL) + patógeno; (8) húmus de minhoca + quitosana (6mg/mL) + patógeno; (9) biofertilizante misto (BNPK) 150% DR + patógeno; (10) Solo + patógeno; (11) Solo sem patógeno. O bioprotetor (PNPK) com rochas PK e a quitosana com húmus de minhoca, em diferentes concentrações, mostraram eficácia na absorção de nutrientes, aumentando a disponibilidade de nutrientes no solo e na planta, especialmente para N total, P e K disponíveis. A utilização de húmus de minhoca proporcionou maior quantidade de matéria seca em ambos solos utilizados. Assim, o bioprotetor e a quitosana aplicada via foliar com adição de húmus é uma alternativa viável com grande potencial em substituição aos fertilizantes solúveis convencionais.

Palavras-chave: Biofertilizante de rochas, biopolímero, fertilizantes alternativos, fonte de nutrientes no solo.

ABSTRACT

Biofertilizers produced from PK rocks with *Acidithiobacillus* plus organic material (earthworm compound) enriched in N by free-living diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan (*Cunninghamella elegans*), can be applied as an alternative to conventional fertilizers (FNPK). The objective of this work is to evaluate the effect of different nutrient sources, for alternative use of the bioprotector and commercial (crustacean) chitosan applied by foliar, in the substitution of conventional fertilizers, in a greenhouse with a Yellow Red Latosol from Zona da Mata Pernambuco. Two simultaneous experiments (A and B) were performed with sterilized soil and non-sterilized soil. The design was a completely randomized design with 11 treatments, with three replications. The treatments were: (1) soluble fertilizers (FNPK) at the recommended dose (RR) + pathogen; (2) bioprotectant (PNPK) 50% RR + pathogen; (3) PNPK 100% RR + pathogen; (4) PNPK 150% RR + pathogen; (5) worm humus (HM) + pathogen; (6) earthworm humus + chitosan (2mg / mL) + pathogen; (7) earthworm humus + chitosan (4mg / mL) + pathogen; (8) earthworm humus + chitosan (6mg / mL) + pathogen; (9) mixed biofertilizer (BNPK) 150% RR + pathogen; (10) Only of Zona da Mata + pathogen; (11) Soil of the Zona da Mata without pathogen. The bioprotectant (PNPK) with PK rocks and chitosan with earthworm humus, in different concentrations, showed efficacy in nutrient absorption, increasing nutrient availability in soil and plant, especially for total N, P and K available. Thus, the bioprotector and the chitosan applied via foliar with humus addition is a viable alternative with great potential in substitution to the conventional soluble fertilizers.

Keywords: Biofertilizer of rocks, biopolymer, alternative fertilizers, source of nutrients in the soil.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna exige o uso de fertilizantes e corretivos objetivando o aumento da produtividade das culturas e da produção de alimentos, de modo a atender critérios econômicos e ao mesmo tempo à conservação da biodiversidade e da fertilidade do solo (ANDRADE et al., 2009; STAMFORD et al., 2008). A fertilização é um fator muito importante que afeta a produtividade e a disponibilidade de nutrientes no solo, podendo promover aumento no rendimento das plantas e melhorar o sistema de culturas agrícolas (STAMFORD et al., 2008).

São necessários estudos que visem o desenvolvimento de biofertilizantes alternativos em substituição ao uso de fertilizantes e insumos agrícolas convencionais (fertilizantes minerais solúveis) atualmente utilizados, a fim de que haja uma agricultura sustentável. Os fertilizantes convencionais, além de onerosos, são agressivos ao ambiente. Também vale salientar que o alto custo dos fertilizantes solúveis contribui diretamente para a redução de sua aplicação, particularmente quando diz respeito ao uso por parte de agricultores de baixa renda (SANCHES et al., 2002).

Os fertilizantes solúveis consomem uma quantidade substancial de energia e podem favorecer a ocorrência de problemas ambientais devido à lixiviação de nutrientes solúveis para as camadas mais profundas do solo (STAMFORD et al., 2005; STAMFORD et al., 2014; SILVA et al., 2016). Os biofertilizantes de rochas fosfatadas (BP) e de rochas potássicas (BK) com adição de enxofre elementar e *Acidithiobacillus* apresentam-se como alternativa viável a fertilizantes solúveis convencionais.

Tais biofertilizantes já mostraram eficiência agronômica para várias culturas, sendo um processo prático que reduz o consumo de energia e promove maior disponibilidade de nutrientes para as plantas (STAMFORD et al., 2014). Estes fertilizantes alternativos podem ser produzidos sem o uso de temperaturas elevadas e nem adição de produtos tóxicos e corrosivos, como os ácidos fosfórico e sulfúrico, podendo sua produção ser realizada por grandes, médios e pequenos agricultores (STAMFORD et al., 2008).

O biofertilizante misto (BNPK), quando acrescido da biomassa micelial do fungo *Cunninghamella elegans*, é denominado de bioprotetor (PNPK), tendo em vista que contém fungos da Ordem Mucorales, como *C. elegans*, que adicionam quitina e quitosana ao produto (FRANCO et al., 2005); este biopolímero promove resistência a doenças (OLIVEIRA et al., 2017; BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2016). O

fungo *C. elegans* também favorece a formação de polifosfato inorgânico que aumenta a disponibilidade de nutrientes para as plantas, especialmente P e N (FRANCO et al., 2011), e, portanto, pode contribuir para a produtividade agrícola.

As condições ambientais, fitossanitárias, as características genéticas e a baixa fertilidade do solo são alguns dos fatores que interferem no desenvolvimento das plantas, como é o caso da cultura do feijão-caupi, reduzindo sua produtividade média que na região semiárida é de apenas 300 a 400 kg/ha (SOBRAL, 2008).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma cultura amplamente distribuída no mundo. Entre os anos de 2005 a 2009, a área ocupada com feijão-caupi no mundo foi de 12.218.774 milhões de hectares, com produção anual de 5.641.762 toneladas e produtividade de 461,8 kg/ha. Os principais países produtores foram: Nigéria, Níger e Brasil (FREIRE FILHO et al., 2011).

Essa leguminosa é de grande importância socioeconômica, destacando-se como constituinte na dieta alimentar da população, principalmente das regiões norte e nordeste do Brasil e como alimento básico para as populações de baixa renda, em especial na região semiárida. Além de se apresentar como excelente fonte nutricional, suas características de rusticidade e ciclo curto, promove tolerância à seca e ao calor e baixa exigência hídrica, podendo proporcionar excelente cobertura vegetal, evitando o desenvolvimento de ervas daninhas no campo e sendo utilizado também na alimentação animal (XAVIER et al., 2005; ANDRADE JÚNIOR et al., 2000).

O trabalho tem como principal objetivo avaliar o efeito de diferentes fontes de nutrientes, visando mostrar a possibilidade de uso alternativo do bioprotetor (PNPK) em substituição aos fertilizantes solúveis convencionais. A pesquisa também observou o efeito da adição de húmus de minhoca conjuntamente com quitosana de crustáceos (comercial) aplicada via foliar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local do experimento e solo utilizado

O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE/Recife). O clima da região é considerado como As' de acordo com a classificação de Köppen, adaptada no Brasil, sendo considerado como clima equatorial com verão seco.

O solo utilizado no experimento foi classificado como Latossolo Vermelho Amarelo (EMBRAPA, 2009), com coleta feita na camada de 0 a 20 cm em área localizada no município de Paudalho, Zona da Mata do estado de Pernambuco.

Após a coleta do solo, as amostras foram secas ao ar destorroadas e passadas em peneiras de 2 mm de diâmetro, homogeneizadas e analisadas quanto às características químicas e físicas (Tabela 1) no Laboratório de Fertilidade e de Física do Solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), usando a metodologia da EMBRAPA (2009).

Tabela 1: Características químicas e físicas do Latossolo Vermelho Amarelo (Paudalho, PE).

pH água	N	C	P	K	Ca	Mg	Na	Al	CTC	V
	g kg ⁻¹	g kg ⁻¹	mg dm ⁻³	----- cmol _c dm ⁻³ -----			-----			-%-
5,40	0,06	0,65	4,00	0,04	1,70	0,60	0,04	0,05	2,4	52,0
Areia grossa		Areia fina		Silte		Argila		Classificação Textural		
-----		-----		-----		-----		-----		
45,00		27,00		6,00		22,00		Franco Argilo Arenoso		

2.2 Biofertilizante misto (BNPK), bioprotetor (PNPK) e fertilizante solúvel (FNPK)

O biofertilizante misto (BNPK) e o bioprotetor (PNPK) utilizados como fontes de fertilizante natural foram cedidos pelo laboratório de Biotecnologia Ambiental da Universidade Federal Rural de Pernambuco e analisados no laboratório de Fertilidade e de Física do solo do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA).

O bioprotetor (PNPK) foi produzido seguindo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2016), a partir de rocha fosfatada e de rocha potássica, com adição de enxofre

elementar inoculado com a bactéria *Acidithiobacillus thiooxidans*. O biofertilizante de rochas com P e K participa como fonte de fósforo, cálcio, potássio e magnésio, sendo o fósforo e o cálcio cedidos pela rocha fosfatada, o potássio e o magnésio cedidos pela rocha potássica e o enxofre através da reação do S elementar liberando sulfato na formação de ácido sulfúrico.

Após a produção dos biofertilizantes de rochas (BPK) foi feita a mistura com matéria orgânica (MO) inoculada com bactéria diazotrófica de vida livre na proporção 3:1 (MO: BPK). Para enriquecimento em N promovido pelo processo de fixação biológica de N₂, é necessária a adição de matéria orgânica de rápida degradação, como resíduo de sorvete, resíduos de bebidas, entre outras fontes, para potencial multiplicação da bactéria, visando aumentar o N pelo processo da fixação biológica do nitrogênio (FBN) e produção de biofertilizante misto (BNPK), de acordo com Lima et al. (2010). A seguir foi adicionado ao biofertilizante misto o fungo da Ordem Mucorales (*C. elegans*), o qual contém em sua parede celular quitina e quitosana, visando à produção do bioprotetor (PNPK) (Figura 1).

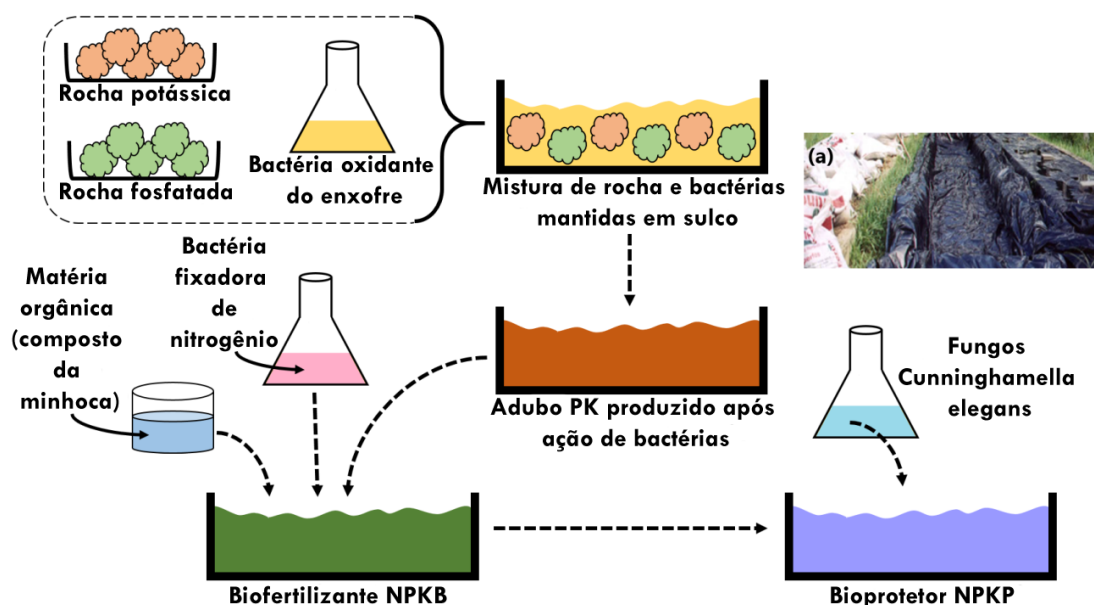


Figure 1. Esquema simplificado da produção do biofertilizante (NPKB) e bioprotetor (NPKP). Os sulcos cobertos com plástico preto em campo são mostrados em (a)

Fonte: Adaptado de Barreto et al. (2016)

A análise do biofertilizante de rocha com fósforo (BP) e com potássio (BK), de acordo com a metodologia da EMBRAPA (2009) forneceu para BP o pH = 3.8; P disponível = 60 g kg⁻¹; para BK, pH = 3.3; K disponível = 0.5 g kg⁻¹. A análise do

biofertilizante misto (BNPK) produzido com húmus de minhoca e resíduo de sorvete na proporção MO: BPK correspondente a 3:1 mostrou pH = 6.2, N total = 20 (g kg⁻¹); P disponível (Mehlich 1) = 15 (g kg⁻¹) e K disponível (Mehlich 1) = 10 (g kg⁻¹).

O fertilizante NPK solúvel (FNPK) foi produzido com a mistura dos fertilizantes convencionais: sulfato de amônio (20% N), superfosfato simples (60% de P₂O₅) e sulfato de potássio (50% de K₂O), seguindo a recomendação do IPA (2008) para o feijão-caupi.

2.3 Delineamento Experimental

Foram realizados dois experimentos simultâneos (A e B), sendo um com o solo autoclavado e o outro com solo não autoclavado, para avaliar o efeito do PNPK e BNPK em relação ao fertilizante solúvel convencional, húmus de minhoca com e sem quitosana de crustáceo (comercial) aplicada via foliar em diferentes concentrações. Nos dois experimentos o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com 11 tratamentos e três repetições.

Os tratamentos foram: (1) fertilizantes solúveis (FNPK) na dose recomendada (DR) + patógeno; (2) bioprotetor (PNPK) 50% DR (5 g/vaso) + patógeno; (3) PNPK 100% DR (10 g/vaso) + patógeno; (4) PNPK 150% DR (15 g/vaso) + patógeno; (5) húmus de minhoca (HM) (30g/vaso) + patógeno; (6) húmus de minhoca (30 g/vaso) + quitosana (2mg/mL) + patógeno; (7) húmus de minhoca (30 g/vaso) + quitosana (4mg/mL) + patógeno; (8) húmus de minhoca (30 g/vaso) + quitosana (6mg/mL) + patógeno; (9) biofertilizante misto (BNPK) 150% DR (15 g/vaso) + patógeno; (10) Solo + patógeno; (11) Solo sem patógeno. A adição da quitosana foi realizada de acordo com as concentrações mais promissoras determinadas no teste “*in vitro*”. O cálculo do bioprotetor foi procedido usando a recomendação do Ipa (2008), com base no teor de fósforo no solo.

2.4 Condução dos experimentos

Os experimentos foram realizados no período de 03 de junho a 23 de julho de 2016, utilizando vasos plásticos com capacidade para 4 litros nos quais foram acondicionados 4 kg de solo por vaso; em função da acidez natural do solo foi feita adição de calcário (2 g/vaso de CaCO₃), com calagem correspondente a 2 t/ha.

A esterilização do solo (experimento B) foi realizada mediante autoclavagem por três vezes consecutivas em um intervalo de 24 horas, a 121° C, durante 60 minutos, e após oito dias o solo foi utilizado para realização do experimento em casa de vegetação. Após este período foram instalados os experimentos.

Para o bioprotetor e biofertilizante misto foram adicionadas as quantidades conforme descritas no item anterior. Para os vasos com fertilizante mineral solúvel foi preparada uma mistura de superfosfato simples (60% de P_2O_5), sulfato de potássio (50% de K_2O) e sulfato de amônio (20% N), calculada conforme a dose recomendada para a cultura do feijão-caupi no estado de Pernambuco (IPA, 2008). No tratamento controle foram adicionados 30g de húmus de minhoca por vaso (correspondente a 30 t/ha). Os tratamentos foram adicionados na superfície do solo antes da semeadura.

2.5 Obtenção e preparo das sementes

Sementes da cultivar de feijão-caupi Miranda IPA 207 foram cedidas pelo Programa de Melhoramento de Feijão do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) para a instalação dos bioensaios. Depois de selecionadas, as sementes foram desinfetadas por meio da exposição a álcool etílico (95%) durante um minuto e submetidas à imersão com hipoclorito de sódio (2%) durante cinco minutos; em seguida houve 10 lavagens sucessivas com água destilada. Posteriormente foi feita a semeadura de sete sementes por vaso, mantendo-se após o desbaste cinco plantas/vaso.

Durante a condução do experimento em casa de vegetação, a umidade foi suprida com adição diária de água destilada para manter a umidade em torno de 80% da retenção máxima. A temperatura oscilou entre 20 e 37° C e a umidade relativa foi 60-80%. Aos sete dias após a germinação, a quitosana foi pulverizada nas folhas do feijão.

2.6 Obtenção e preparo do gel de quitosana

Para aplicação da quitosana foi preparado gel do biopolímero para posterior pulverização nas folhas do caupi. A quitosana foi dissolvida em ácido acético (1%) e mantida sob agitação durante 24 horas, com pH ajustado para 6,5 (NaOH 1%), obtendo-se as concentrações finais de 2,0, 4,0 e 6,0 (mg/mL), conforme metodologia descrita por Di Piero e Garda (2008).

2.7 Pulverização da quitosana

A pulverização com quitosana foi realizada sete dias após a germinação, utilizando vidros de spray nas folhas primárias, sendo a quantidade determinada de 4 mL/planta. Nove dias após a germinação foi realizada a inoculação com *S. rolfsii*.

2.8 Obtenção e inoculação do patógeno

O isolado de *S. rolfsii* foi repicado para placas de Petri e mantidas por 15 dias em câmara BOD a 28° C, com fotoperíodo de 12 horas. A inoculação foi realizada conforme metodologia descrita por Dantas et al. (2002), com modificações, utilizando-se um disco de micélio. A inoculação foi procedida ferindo-se levemente o colo de cada planta com estilete flambado em apenas um local e depositando-se apenas um disco de micélio com esclerócios sobre o ferimento. Todas as plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas.

2.9 Matéria seca da parte aérea

Aos 50 dias após a germinação foi determinada a matéria seca da parte aérea (MSPA); o material vegetal foi acondicionado em sacos de papel identificados e posteriormente secado em estufa de circulação de ar forçada a 65° C durante 72 horas. Após a secagem, realizou-se a pesagem do material em balança de precisão.

2.10 Análises químicas na planta

Após a obtenção da MSPA, o material foi moído para posterior análise de N, P e K de acordo com as recomendações da EMBRAPA (2009). O P e o K foram analisados por digestão nitroperclórica, sendo o P pelo método colorimétrico (molibdato de amônio e ácido ascórbico) e o K por fotometria de chama. A análise de N total da parte aérea foi realizada pelo método de Kjeldhal (semi-micro) de acordo com Tedesco et al. (1995).

2.11 Análises químicas do solo

As análises de solo foram realizadas no Laboratório de Química do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As amostras do solo foram secas ao ar e passadas em peneiras (2 mm), obtendo-se a terra fina seca (TFSA) utilizadas nas determinações químicas. As análises do solo foram realizadas de acordo com a metodologia da EMBRAPA (2009), sendo o pH determinado em água por potenciometria, utilizando o pHmetro (modelo mPA-210); o P e o K disponíveis foram extraídos com solução extratora (Mehlich 1), sendo o K determinado por fotometria de chama e o P por colorimetria. O Ca e o Mg trocáveis foram extraídos com solução extratora (KCl) e determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O N total do solo também foi determinado de acordo com Tedesco et al. (1995).

2.12 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados pelo programa estatístico Sisvar versão 5.3, sendo realizada a ANOVA e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Matéria seca da parte aérea

A utilização de solo não autoclavado proporcionou maiores valores ($P < 0,05\%$) de matéria seca da parte aérea em relação à utilização de solo autoclavado (Figura 2). Provavelmente a exposição do solo a altas temperaturas pode alterar a composição química do solo. De acordo com Pereira (2013), solos com diferentes propriedades químicas irão se comportar de modo diferente sob o mesmo sistema de manejo, o que pode interferir na produção das culturas.

Por outro lado, a esterilização do solo pode matar toda forma de vida presente no material, incluindo os micro-organismos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005). De acordo com Souza et al. (2006), a maioria das espécies vegetais superiores possuem associação entre raízes e determinados fungos do solo, denominado micorriza. Segundo Siqueira e Franco (1988) a colonização das raízes das plantas pelos fungos resulta em micélio abundante na rizosfera, o que ajuda a planta a absorver nutrientes do solo e do húmus. Além disso, alguns fungos desempenham papel crucial na nutrição mineral de plantas vasculares (SOUZA et al., 2006).

Tais resultados assemelham-se aos encontrados no trabalho de Gross, Cordeiro e Caetano (2004), os quais, avaliando a nodulação e micorrização em *Anadenanthera peregrina* var. *falcata* em solo de cerrado autoclavado e não autoclavado, observaram separadamente a produção de massa seca na raiz e na parte aérea, onde as plantas do solo não autoclavado apresentaram os maiores valores ao longo dos 10 meses em que se realizaram os experimentos. Estes autores atribuem este resultado a um provável efeito sinérgico dos microssimbiontes nessas plantas.

Ainda acerca dos melhores resultados obtidos com o uso do solo não autoclavado, é importante salientar que a microbiota do solo controla a disponibilidade de nutrientes levados às plantas através da decomposição da matéria orgânica e ciclagem de elementos, atuando, portanto, como fonte e dreno de nutrientes, além de participar dos ciclos biogeoquímicos dos elementos, incluindo a fixação biológica do N_2 , proporcionando assim maior desenvolvimento da comunidade vegetal nestes ambientes (SIQUEIRA; MOREIRA, 2002).

Para o solo autoclavado, uma maior quantidade de matéria seca da parte aérea do feijão foi obtida com os tratamentos que utilizaram o húmus de minhoca, independente

do complemento que foi acrescentado. Já para o solo não autoclavado, além dos tratamentos contendo húmus de minhoca, os tratamentos BM + P e FNPk + P também apresentaram mais matéria seca em relação aos demais tratamentos. Ainda para o solo não autoclavado, a utilização de biofertilizantes e a adição da quitosana ao húmus de minhoca nas diferentes concentrações produziram uma maior ($P < 0,05\%$) quantidade de matéria seca em relação aos tratamentos testemunhas SP + P e SP (Figura 2).

Sheikha e Al-Malki (2011) indicam que a aplicação de diferentes concentrações de quitosana no feijão aumentou o comprimento da parte aérea e da raiz, o peso fresco e seco dos brotos, a área radicular e foliar e o nível de clorofila nas folhas dessa planta. Doares et al. (1995) sugerem que a atuação da quitosana no crescimento da planta ocorra mediante a ativação transcricional que ela induz através das vias envolvendo o ácido jasmônico.

Em ambos os solos utilizados, verifica-se que os tratamentos contendo o húmus podem substituir o fertilizante tradicional utilizado, sendo considerado igual no caso do solo não autoclavado. Possivelmente se alcançou este resultado em virtude da presença de micro-organismos que existem no húmus, o que levaria a uma reposição dos fungos que foram mortos durante o processo de autoclavagem, os quais podem contribuir no processo de absorção de nutrientes do solo pela planta.

Em sistema de produção, a utilização de húmus de minhoca apresenta-se como uma prática potencial para otimização da cadeia de produção de feijão, pois os adubos orgânicos são produzidos com materiais facilmente encontrados em propriedades rurais (PEREIRA et al., 2013). A produção de húmus de minhoca é fácil e barata, podendo ser feita pelo próprio produtor sem exigir grande mão de obra. Cavalcante et al. (2009) afirmam que a utilização de húmus de minhoca e biofertilizantes beneficia o feijoeiro *vigna* quando incorporados ao solo, registrando-se aumento em sua produtividade.

O aumento da matéria seca da planta ocorreu provavelmente devido à adição de matéria orgânica no solo, que resulta em muitos efeitos benéficos, tais como melhoria nas propriedades biológicas, físicas e químicas do solo, aumentando dessa forma o fornecimento de nutrientes às plantas (SANTANA et al., 2012).

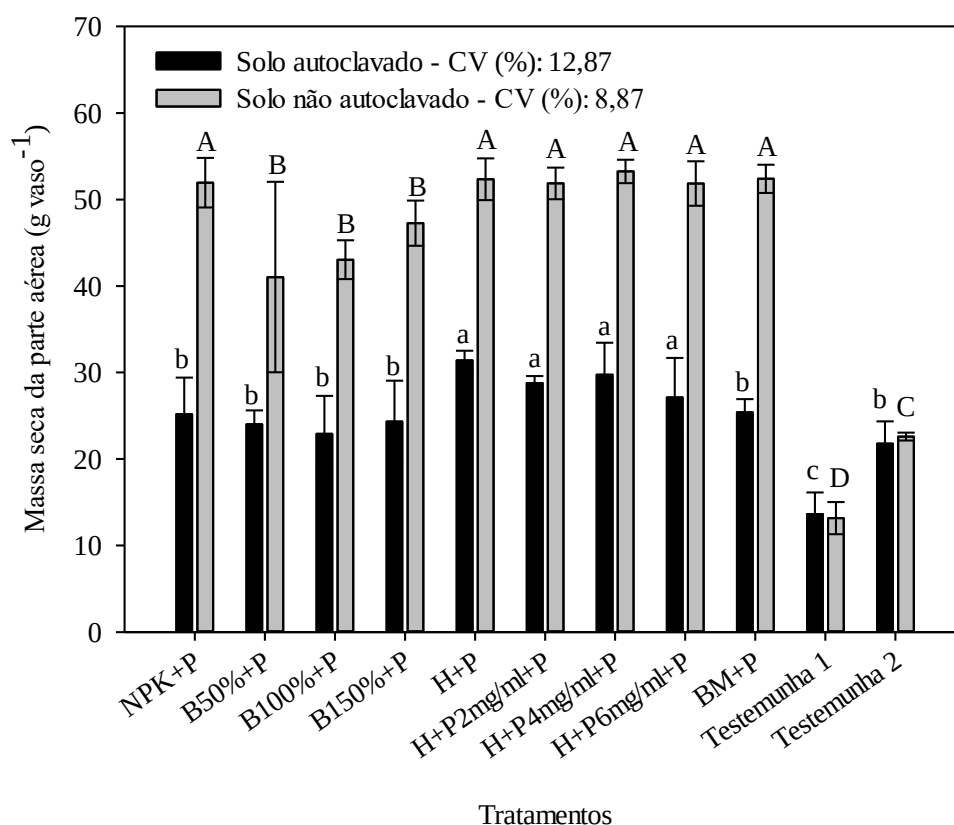


Figure 2 Matéria seca da parte aérea do feijão-caupi (g/vaso) coletada 50 dias após a germinação no solo não autoclavado e autoclavado. Médias seguidas por letras maiúsculas iguais, para solo não autoclavado e minúsculas iguais para solo autoclavado, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P \leq 0,05$). FNPk: fertilizante convencional; PNPK: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; CV: coeficiente de variação.

3.2 Análises químicas das plantas

Em relação à presença do nitrogênio acumulado na parte aérea do feijão, foi observada uma tendência de maiores quantidades no solo não autoclavado em relação ao solo autoclavado (Tabela 2). Este resultado provavelmente ocorreu em virtude da esterilização do solo, a qual extermina todos os micro-organismos do mesmo, incluindo as bactérias fixadoras de nitrogênio, cuja ausência diminui o potencial de absorção desse nutriente presente no solo realizado pela planta.

Tabela 2: Nitrogênio N (mg kg^{-1}), fósforo P (mg kg^{-1}) e potássio K (mg kg^{-1}) acumulados na parte aérea de plantas do feijão-caupi, coletada 50 dias após a germinação no solo não autoclavado e solo autoclavado.

Tratamentos	Solo não autoclavado			Solo autoclavado		
	N	P	K	N	P	K
FNPK + P	217a	9,3b	54,5b	167a	9,2a	60,5a
PNPK 50% + P	170b	6,8b	43,5b	104b	5,3b	30,3b
PNPK 100% + P	180b	6,9b	49,8b	100b	7,3b	40,8b
PNPK 150% + P	218a	8,5b	49,3b	143a	9,3a	46,1b
HM + P	248a	14,6a	63,6a	166a	10,0a	71,2a
HM + Q 2mg/mL + P	255a	13,4a	74,0a	165a	13,8a	72,1a
HM + Q 4mg/mL + P	259a	15,9a	83,8a	162a	12,1a	66,2a
HM + Q 6mg/mL + P	264a	14,5a	63,7a	142a	9,9a	58,9a
BM + P	248a	13,9a	79,0a	149a	9,9a	60,6a
testemunha 1	45d	1,4c	14,2d	54c	2,3c	22,2c
testemunha 2	80c	2,1c	21,1c	57c	3,0c	24,2c
CV (%)	5,24	11,43	9,95	16,68	11,66	12,80

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

FNPK: fertilizante convencional; PNPK: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

Para todas as variáveis analisadas (N, P e K) em ambos os solos utilizados, observou-se que os tratamentos contendo húmus de minhoca, independente da adição de quitosana nas diferentes concentrações e BNPK (150%) foram os que apresentaram maiores quantidades desses nutrientes ($P < 0,05$) acumulados na parte aérea do feijão (Tabela 2).

Os níveis de nitrogênio independentemente da condição do solo utilizado foram superiores nos tratamentos PNPK 150%, BNPK e húmus de minhoca acrescido das diferentes concentrações de quitosana e estes não diferiram do tratamento que utilizou o fertilizante convencional FNPK. O P do solo autoclavado também apresentou estes mesmos resultados.

Os tratamentos PNPK 50% e 100% tiveram quantidades de N, P e K inferiores aos tratamentos acima citados, porém estes nutrientes acumulados foram maiores quando comparados as testemunhas 1 e 2, demonstrando dessa forma que a quitosana e o bioprotetor nas doses 50%, 100% e 150% e o biofertilizante testados podem ser utilizados a fim de proporcionar aumento no acúmulo de N, P e K na parte aérea do feijão-caupi.

A quitosana é amplamente utilizada em aplicações agrícolas, principalmente produzindo estímulos de defesa na planta (NAEEM; HASSAN; EL-SAYED, 2010). A

utilização de quitosana promoveu crescimento de raízes, brotos e folhas e proporcionou aumento nos componentes de rendimento em vegetais incluindo o feijão-caupi (EL TANAHY et al., 2012; FAROUK; AMANY, 2012). Nesta mesma espécie, El Tanahy et al. (2012) observaram que os níveis de N, P e K foram aumentados nas sementes em que se utilizou a quitosana.

De acordo com Guan et al. (2009), o efeito estimulante da quitosana no crescimento das plantas pode ser atribuído a um aumento na disponibilidade e absorção de água e nutrientes essenciais mediante ajuste da pressão osmótica celular e da redução da acumulação de radicais livres nocivos pelo aumento de antioxidantes e atividades enzimáticas. Corroborando com o pensamento do autor supracitado, Boonlertnirum, Boonraung e Suvanasara (2008) relata que a quitosana aumenta a disponibilidade de nutrientes porque serve como fonte de carbono para os micro-organismos do solo, ajudando a acelerar o processo de mineralização da matéria orgânica, liberando, dessa forma, os nutrientes que são facilmente absorvidos pelas plantas.

Outros trabalhos relatam o aumento de N, P e K após a utilização do biopolímero quitosana, a exemplo de estudos realizados por El-Miniawy et al. (2013) com a aplicação de quitosana na cultura do morango, onde observaram aumento no teor de nitrogênio das folhas. Estes mesmos autores verificaram para o fósforo e o potássio que a pulverização de quitosana aumentou os teores percentuais nos tecidos foliares em comparação com o controle.

Verificou-se no presente estudo que o resultado proveniente do húmus de minhoca deve-se à quantidade utilizada (30g/vaso), sendo a mais indicada para obter maior acúmulo de N, P e K na parte aérea de feijão-caupi. De acordo com Pereira et al. (2009), a adubação orgânica pode proporcionar boas condições físicas, químicas e biológicas para a planta, o que afetará seu desempenho.

Os níveis de pH podem ter influenciado a obtenção destes resultados, para os quais, de acordo com a tabela 3, os tratamentos que apresentaram maiores valores de N, P e K foram os mesmos que apresentaram o pH mais alto, ou seja, mais próximo do pH neutro. De acordo com Malavolta (1979), a disponibilidade dos nutrientes sofrem influência do pH do solo. O nitrogênio (N) é mais bem aproveitado pela planta em solo com pH acima de 5,5, enquanto a disponibilidade máxima verifica-se na faixa de pH do solo entre 6 e 6,5 para depois diminuir; o fósforo tem melhor disponibilidade para as plantas com pH 6 a 6,5, enquanto o potássio é melhor aproveitado em solo com pH maior que 5,5.

3.3 Análise químicas no solo

3.3.1 Análise de pH

Os valores de pH do solo autoclavado e não autoclavados foram semelhantes (Tabela 3), demonstrando dessa forma que a elevação da temperatura não afetou o pH do solo.

Conforme as análises dos nutrientes, os maiores valores de pH foram obtidos para os tratamentos que utilizaram húmus de minhoca independente do complemento de quitosana e o tratamento BNPK em ambos os solos (Tabela 3). Por outro lado, a utilização do tratamento contendo PNPK 150% foi o que apresentou níveis de pH mais baixos. O pH pode influenciar na absorção de nutrientes pelo feijão-caupi, para o qual o pH acima de 5,5 é considerado adequado para seu cultivo (FREIRE FILHO; LIMA; RIBEIRO, 2005), indicando que os tratamentos utilizados, exceto PNPK 150%, podem ser considerados dentro da faixa ideal para a cultura.

Stamford et al. (2004; 2006; 2009) mostraram redução no pH do solo após a aplicação de biofertilizante de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre inoculado com *Acidithiobacillus* no solo devido à produção de H_2SO_4 por esta bactéria. O efeito do biofertilizante misto e do húmus de minhoca no solo pode ser explicado pela maior quantidade de matéria orgânica em sua composição em relação à quantidade de biofertilizante de rochas fosfatada e potássica.

O tratamento que utilizou o fertilizante convencional (FNPK) apresentou o pH mais baixo em relação aos tratamentos em que foram acrescentados quitosana nas diferentes concentrações, sugerindo que estes tratamentos podem contribuir para o aumento do pH do solo.

Tabela 3: pH (1,0:2,5) no solo após 50 dias de cultivo do feijão-caupi no solo não autoclavado e solo autoclavado

Tratamentos	pH (H ₂ O)	
	Solo não autoclavado	Solo autoclavado
FNPK + P	5,80 c	5,80 c
PNPK 50% + P	5,97 c	5,60 c
PNPK 100% + P	5,77 c	5,50 c
PNPK 150% + P	5,53 d	5,33 d
HM + P	6,37 a	6,43 a
HM + Q 2mg/mL + P	6,53 a	6,47 a
HM + Q 4mg/mL + P	6,63 a	6,43 a
HM + Q 6mg/mL + P	6,47 a	6,47 a
BM + P	6,40 a	6,43 a
testemunha 1	6,17 b	6,18 b
testemunha 2	6,10 b	6,27b
CV (%)	2,01	1,37

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott ($P < 0,05$).

FNPK: fertilizante convencional; PNPK: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

Os tratamentos contendo PNPK 50%, 100% e 150% foram os que apresentaram pH mais baixos. De acordo El Tarabily et al. (2006), os biofertilizantes produzidos com rochas P e K em que são inoculadas bactérias oxidantes de enxofre que produzem ácido sulfúrico, contribuem para reduzir o pH do solo. Portanto, é necessário utilizar matéria orgânica com alto pH para controlar os efeitos ácidos dos biofertilizantes de rochas (LIMA et al., 2010).

A queda do pH causada pelo fertilizante mineral solúvel, mais especificamente o sulfato de amônio aplicado como fonte de nitrogênio, também foi observado por Berger et al. (2013), estes autores observaram baixos valores de pH (aproximadamente 5,0) em resposta à utilização de fertilizantes minerais no cultivo do caupi. Os mesmos relatam que este efeito provavelmente ocorreu devido à adição de sulfato de amônio (fertilizante mineral N), que pode aumentar a acidez do solo.

O pH é um índice que indica o grau de acidez do solo, o mesmo é de extrema importância porque determina a disponibilidade dos nutrientes contidos no solo ou a ele adicionados, além de ser também responsável por determinar a assimilação dos nutrientes pelas plantas. As características orgânicas são de inestimável valor, uma vez que melhoram principalmente os atributos físico-químicos e biológicos, possibilitando

assim um desempenho muito melhor dos fertilizantes minerais (ALCARDE; GUIDOLIN; LOPES, 1998).

A utilização de húmus de minhoca, independente do complemento, aumentou os níveis de pH neste experimento. De acordo com Guarçoni e Mendonça (2003) a matéria orgânica pode elevar o pH do solo através da elevada adsorção de compostos orgânicos por troca de ligantes, devido a liberação de grupamentos OH^- para a solução do solo; a matéria orgânica pode formar complexos com Al^{3+} , diminuindo a acidez trocável.

3.3.2 Solo autoclavado

Na análise química do solo autoclavado observou-se novamente que a utilização do húmus de minhoca acrescido das diferentes concentrações de quitosana e o tratamento BNPK, apresentaram maiores ($P < 0,05$) níveis de N no solo e estes diferiram do tratamento que utilizou o fertilizante convencional e das testemunhas 1 e 2 (Tabela 4), demonstrando dessa forma que podem ser utilizados como alternativos em substituição ao fertilizante convencional.

O efeito da quitosana sobre os níveis de N, possivelmente deve-se ao fato de a quitosana conter nitrogênio na unidade básica de sua fórmula (BECKER; SCHLAAK; STRASDEIT, 2000); de acordo com estes mesmos autores, quando o nitrogênio contido na quitosana é dissolvido, ela penetra gradualmente e permanece no solo por um longo tempo, podendo melhorar o transporte de nitrogênio em plantas.

O nitrogênio é o nutriente responsável pelo crescimento das plantas e também pela produção de novas células e tecidos, além disso, promove o desenvolvimento de órgãos de armazenamento como raízes, tronco e ramos, elevando a capacidade de armazenamento de carboidratos (BELL; HENSCHLE, 2005).

Para todas as variáveis analisadas (N, P, Ca, Mg e K), os tratamentos contendo PNPK 100% e 150%, BNPK 150% e húmus de minhoca nas diferentes concentrações de quitosana apresentaram resultados melhores ou semelhantes ($P \leq 0,05$) em relação ao tratamento controle que utilizou fertilizante convencional (Tabela 4), sugerindo que a utilização destes componentes podem ser utilizados no cultivo do feijão-caupi em substituição ao uso de FNPK.

O biofertilizante é um produto rico em nutrientes como P, K, Ca e Mg, mas não possui nitrogênio em sua composição (SANTOS et al., 2008). A mistura de fertilizantes de rochas com material orgânico proporciona aumento no pH do substrato, bem como

realiza a adição de nitrogênio para as plantas. Utilizando biofertilizante misto, obtém-se um produto com pH adequado e quando realizada a inoculação com bactérias diazotróficas de vida livre ocorre o enriquecimento em N (LIMA et al., 2010), e este processo eleva a fertilidade do solo.

Em relação à utilização do húmus de minhoca + as diferentes concentrações de quitosana, não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre as concentrações utilizadas para todos os nutrientes analisados. Este resultado provavelmente ocorreu devido ao meio de aplicação da quitosana ser via foliar, não entrando em contato com o solo.

Os melhores resultados obtidos com a utilização do húmus podem ter ocorrido em função da grande quantidade desta matéria orgânica por vaso (30 g de húmus de minhoca por vaso). Para o bioprotetor foram aplicados 4 g por vaso, 8 g por vaso e 12 g por vaso respectivamente para 50%, 100% e 150%; para o biofertilizante usou-se 12 g por vaso para o tratamento com a dose 150%.

Para o P os tratamentos que utilizaram PNPK 50%, 100%, 150%, húmus de minhoca acrescido das diferentes concentrações de quitosana e apresentaram maiores níveis desse nutriente em relação aos grupos controles: FNPk (fertilizante convencional) e testemunhas 1 e 2, sugerindo, assim como para o N, que os biofertilizantes e bioprotetores podem atuar no aumento dos níveis dessa variável (Tabela 4). Dentre os tratamentos testados para verificar os níveis de P, a utilização de PNPK 100% e 150% foram os que apresentaram maiores níveis para essa variável.

De acordo com Xu, Wof e Kafkafi (2002), a disponibilidade do nitrogênio e do potássio e a adequada proporção entre eles no solo são fatores importantes nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, tendo em vista que estes dois nutrientes atuam conjuntamente e o metabolismo de nitrogênio nas plantas requer adequadas quantidades de potássio no citoplasma, sendo importante para a produção de aminoácidos e produtividade das culturas.

Além disso, verificou-se que o potássio está envolvido na fase final do metabolismo do nitrogênio (MARSCHNER, 1995). Entretanto, em contraste com este autor, alguns trabalhos relataram que o potássio está envolvido no início dos processos metabólicos do nitrogênio, como incorporação do nitrogênio mineral e especialmente na redutase do nitrato (RUAN; WU; HARDTER, 1999).

Resultados descritos por Stamford et al. (2008) demonstram o efeito positivo e significativo dos biofertilizantes de rochas com P e K inoculados com *Acidithiobacillus*;

neste trabalho foram observados resultados mais efetivos do que os obtidos com a aplicação de fertilizante solúvel (FNPK). Também foram obtidos resultados similares quando utilizado o biofertilizante misto (BNPK) comparado ao fertilizante solúvel convencional, especialmente com relação ao P disponível no solo. Os autores também verificaram que o P disponível no solo após a colheita foi significativo de acordo com o aumento das doses do biofertilizante aplicado.

Tabela 4: Nitrogênio total no solo (mg/g), fósforo disponível (mg/dm³), cálcio, magnésio e potássio trocáveis), após 50 dias de cultivo do caupi no experimento com solo autoclavado.

Tratamentos	N g kg ⁻¹	P mg dm ⁻³	Ca	Mg cmol _c dm ⁻³	K
FNPK + P	1,23 b	35 d	3,62 c	0,83 c	0,12 a
PNPK 50% + P	1,17 b	55 c	3,40 c	0,70 c	0,07 b
PNPK 100% + P	1,30 b	182 a	4,53 b	0,77 c	0,10 a
PNPK 150% + P	1,33 b	205 a	5,07 a	0,77 c	0,11 a
HM + P	1,47 a	63 c	4,28 b	1,03 b	0,12 a
HM + Q 2mg/mL + P	1,53 a	76 c	4,27 b	0,97 b	0,13 a
HM + Q 4mg/mL + P	1,50 a	76 c	4,17 b	1,07 b	0,12 a
HM + Q 6mg/mL + P	1,47 a	64 c	3,97 b	1,02 b	0,12 a
BM + P	1,50 a	148 b	4,43 b	1,23 a	0,15 a
testemunha 1	0,63 c	12 d	3,10 c	0,60 d	0,04 c
testemunha 2	0,72 c	11 d	3,28 c	0,93 b	0,08 b
CV (%)	5,59	17,38	7,65	11,16	14,51

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott (P<0,05).

FNPK: fertilizante convencional; PNPK: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

Para o Ca, o emprego de PNPK 150% foi o que apresentou maior nível desse nutriente. Os tratamentos que utilizaram o húmus de minhoca adicionado de diferentes concentrações de quitosana, PNPK 100% e 150% e BNPK 150% apresentaram melhores níveis de Ca em relação aos grupos controle (FNPK e testemunhas 1 e 2), podendo dessa forma ser empregados para proporcionar aumento de Ca disponível no solo. Em relação à utilização de PNPK, parece haver uma relação dos níveis de Ca e a porcentagem utilizada, ou seja, quanto maior a quantidade, maior os níveis de Ca presente no solo. Esta relação pode ser justificada devido à rocha fosfatada possuir alto nível de cálcio, o qual deve ter sido disponibilizado pela bactéria *Acidithiobacillus*, durante a fase de produção do biofertilizante misto e do bioprotetor.

Já os níveis de Mg foram maiores no tratamento BNPK, diferindo dos demais tratamentos. Os tratamentos que utilizaram húmus de minhoca independente das diferentes concentrações de quitosana, apresentaram maiores níveis de Mg em relação à utilização dos tratamentos controles: fertilizante convencional (FNPK) e testemunha 2.

O cálcio (Ca) juntamente com o magnésio (Mg) e o enxofre (S) são macronutrientes secundários importantes para as plantas. O cálcio promove a redução da acidez do solo, melhora o crescimento das raízes, aumenta a atividade microbiana e a disponibilidade de molibdênio (Mo) e outros nutrientes. Plantas que apresentam altos teores de cálcio resistem melhor à toxidez do alumínio (Al), cobre (Cu) e manganês (Mn) (GISMONTI, 2009).

Quando se avaliou a presença de K, observou-se que todos os tratamentos utilizados, exceto o PNPK 50%, apresentaram maiores níveis deste nutriente em relação as testemunhas 1 e 2 e foram semelhantes ao tratamento que utilizou o fertilizante convencional, sugerindo assim que para esta variável, os tratamentos utilizados também podem ser substitutos alternativos do fertilizante convencional.

3.3.3 Solo não autoclavado

No uso do solo não autoclavado para os tratamentos que utilizaram a quitosana, não se observou diferença ($P > 0,05$) entre as concentrações testadas para todos os nutrientes analisados no solo do cultivo do feijão (Tabela 5). A utilização do bioprotetor PNPK 150% se mostrou eficiente em aumentar os níveis de N, P, Ca e Mg.

Tabela 5: Nitrogênio total no solo (mg/g), fósforo disponível (mg/dm³), cálcio, magnésio e potássio trocáveis), após 50 dias de cultivo do caupi no experimento com solo não autoclavado

Tratamentos	N	P	Ca	Mg	K
	g kg ⁻¹	mg dm ⁻³		cmol _c dm ⁻³	
FNPK + P	1,20 b	9 b	2,83 b	0,63 a	0,07 b
PNPK 50% + P	1,20 b	31 b	3,17 b	0,65 a	0,07 b
PNPK 100% + P	1,17 b	70 a	3,97 a	0,70 a	0,09 b
PNPK 150% + P	1,40 a	96 a	4,12 a	0,65 a	0,07 b
HM + P	1,57 a	31 b	3,60 b	0,78 a	0,08 b
HM + Q 2mg/mL + P	1,33 a	39 b	4,32 a	0,73 a	0,11 a
HM + Q 4mg/mL + P	1,53 a	31 b	4,25 a	0,75 a	0,11 a
HM + Q 6mg/mL + P	1,40 a	26 b	3,88 a	0,70 a	0,10 a
BM + P	1,37 a	68 a	3,87 a	0,80 a	0,09 b
testemunha 1	0,71 c	8 b	3,47 b	0,50 b	0,68 b
testemunha 2	0,72 c	6 b	3,52 b	0,77 a	0,09 b
CV (%)	9,99	23,55	12,00	25,25	14,93

Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knott (P<0,05).

FNPK: fertilizante convencional; PNPK: Protetor; P: patógeno; HM: húmus de minhoca; Q: quitosana; BM: biofertilizante; testemunha 1: solo sem patógeno; testemunha 2: solo com patógeno; CV: coeficiente de variação.

Na análise do nitrogênio, observou-se que os tratamentos que utilizaram o húmus de minhoca acrescidos das diferentes concentrações de quitosana, PNPK 150% e BNPK apresentaram maiores (P<0,05) níveis desse nutriente, e estes foram superiores aos apresentados pelos tratamentos controle FNPK e testemunha 1 (Tabela 5), demonstrando que estes tratamentos podem ser utilizados em substituição ao fertilizante convencional quando se deseja maiores níveis de nitrogênio disponível no solo, além do custo reduzido que eles apresentam.

Ainda na análise do nitrogênio, verificou-se aumento deste elemento quando se utilizou o tratamento contendo PNPK na proporção de 150% da dose recomendada, a qual mostrou-se superior (P<0,05) às doses de 50% e 100%.

Na análise do fósforo, os maiores níveis desse nutriente foram estatisticamente maiores nos tratamentos PNPK 100% e 150% e BNPK em relação à utilização do PNPK 50%, húmus independente da adição de quitosana e das testemunhas 1 e 2 e FNPK. Em contrapartida, verificou-se que os níveis de P são bastante inferiores aos demais nutrientes. De acordo com Freire Filho, Lima e Ribeiro (2005) este macronutriente é extraído em quantidades bem menores dos que os demais em feijão-

caupi, porém as plantas do Nordeste necessitam de altas quantidades disponíveis no solo.

Em relação à utilização de PNPK, há uma correlação entre a dose utilizada e os níveis de P; estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Lima et al. (2007) em seus estudos realizados com alface em Argissolo do Cariri cearense, onde encontraram correlação positiva entre as doses de biofertilizante e o P disponível no solo.

Resultados obtidos por Stamford et al. (2008) em atributos do solo com cana de açúcar e por Oliveira et al. (2016) em campo com solo da região semiárida de Pernambuco, permitiram concluir que os biofertilizantes de rochas com P e K inoculados em mistura com húmus de minhoca podem ser utilizados como alternativa para substituição de fertilizantes solúveis com NPK.

Stamford et al. (2016) demonstraram a efetividade da aplicação de torta de usina, especialmente no aumento de P disponível do solo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Santos et al. (2010) e Stamford et al. (2016), os quais estudaram a influência da torta de filtro na produtividade da cana de açúcar e no incremento da fertilidade do solo, especialmente em relação ao P e K disponível.

No presente trabalho verificou-se efeito significativo do biofertilizante nas doses 100% e 150% e do BNPK (150%) para o cálcio, tendo em vista que a rocha fosfatada possui alto nível desse nutriente, o qual deve ter sido disponibilizado pela bactéria *Acidithiobacillus*, durante a fase de produção do biofertilizante misto e do bioprotetor. Além destes tratamentos, também observou-se que a utilização da quitosana nas diferentes concentrações proporcionou bons resultados para este nutriente.

Com relação ao magnésio, somente constatou-se diferença entre os tratamentos em relação à testemunha 1, efeito este que pode ter ocorrido em função de a rocha potássica utilizada na produção do biofertilizante (Rocha Relinktum) não possuir magnésio em sua constituição.

Stamford et al. (2014), em trabalho com uvas no Vale do São Francisco (em Latossolo Vermelho Amarelo) verificam que o conteúdo de Ca^{2+} mostrou influência significativa quando aplicado PNPK na maior dose recomendada (150%), seguido por PNPK aplicado na dose de 100%. Os autores também verificaram efeito positivo na disponibilidade de Mg^{+2} ao aplicar BNPK acrescido da biomassa do fungo *C. elegans*.

Com relação ao efeito da adição de quitosana de crustáceo, foi observado efeito pronunciado no cálcio e potássio no solo após o cultivo do caupi, tendo em vista que os

tratamentos que utilizaram somente húmus de minhoca diferiram dos tratamentos onde houve adição da quitosana.

Neste trabalho foi verificado um efeito favorável na utilização de biofertilizante misto para as variáveis N, P, Ca e Mg. Em pesquisa conduzida em casa de vegetação com aplicação de biofertilizante misto em solo de tabuleiro costeiro da Zona da Mata de Pernambuco, Stamford et al. (2006) demonstraram os efeitos positivos no P e K disponível no solo, após o cultivo da cana de açúcar por oito meses consecutivos, especialmente quando aplicado em doses mais elevadas. El Tarabily et al. (2006) descreveram os efeitos de bactérias oxidantes do enxofre na solubilização do P disponível no solo calcário nos Emirados Árabes, promovendo grande aumento na fertilidade do solo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que: o bioprotetor, biofertilizante misto e húmus de minhoca acrescido das diferentes concentrações de quitosana podem ser utilizados como uma alternativa viável em substituição aos fertilizantes solúveis convencionais com NPK. Quanto ao uso de PNPk, recomenda-se a utilização de 150% da dose recomendada, a qual neste trabalho apresentou melhores resultados em relação às demais. No que diz respeito aos tratamentos com quitosana, recomenda-se a utilização de 2mg/mL, pois não houve diferença entre as concentrações testadas.

5. REFERÊNCIAS

- ALCARDE, J. C.; GUIDOLIN, J. A.; LOPES A. S. **Os adubos e a eficiência das adubações**. 3ª ed. São Paulo: ANDA (Associação Nacional para Difusão de Adubos), 1998. 35 p.
- ANDRADE JÚNIOR, A. S. **Viabilidade da irrigação sob risco climático e econômico, nas microrregiões de Teresina e litoral piauiense**. 2000. 585 f. Tese (Doutorado Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.
- ANDRADE, M. M. M. et al. Fertilização mineral e biofertilizante de rochas com *Bradyrhizobium* e fungos micorrízicos arbusculares em caupi. **Agrária**, Recife, v. 4, n. 3, p. 289-292, 2009.
- BARRETO, F. M. V. et al. Beneficial Microorganisms: Current Challenge to Increase Crop Performance. In: ARORA, N. K.; MEHNAZ, S. B. **Bioformulations: for Sustainable Agriculture**. 1 ed. India: Springer India, v. 1, 2016. p. 53-70.
- BELL, S. J.; HENSCHKE, P. A. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 11, n. 3, p. 242–295, 2005.
- BECKER, T.; SCHLAAK, M.; STRASDEIT, H. Adsorption of nickel, zinc and cadmium cations by new chitosan derivatives. **Reacting Function of Polymers**, v. 44, n. 3, p. 289-298, 2000.
- BERGER, L. R. R. STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, País Basco, v. 12, n. 4, p. 195-215, 2016.
- BERGER, L. R. R. et al. Plant and soil characteristics affected by biofertilizers from rocks and organic matter inoculated with diazotrophic bacteria and fungi that produce chitosan. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, Temuco, v. 13, n. 3, p. 592-693, Ago. 2013.
- BOONLERTNIRUN, S.; BOONRAUNG, C.; SUVANASARA, R. Application of Chitosan in Rice Production. **Journal of Metals Materials and Minerals**, Bangkok, v. 18, n. 2, p. 47-52, 2008.
- CAVALCANTE, S. N. et al. Comportamento da produção do feijoeiro macassar (*Vigna unguiculata* L. Walp) em função de diferentes dosagens e concentrações de

biofertilizante. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, supl. esp., n.1, p. 10-14, 2009.

DANTAS, S. A. F. et al. Identificação de fontes de resistência em feijoeiro a *Sclerotium rolfsii*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 5, p. 528-531, Set./Out. 2002.

DI PIERO, R. M.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, Sep. 2008.

DOARES, S. H. et al. Oligogalacturonides and chitosan active plant defensive genes through the octadecanoid pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 10, p. 4095-4098, May 1995.

EL-MINIAWY, S.M. et al. Response of Strawberry Plants to Foliar Spraying of Chitosan. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Faisalabad, v. 9, n. 6, p. 366-372, Abr. 2013.

EL-TANAHY, A. M. M. et al. Effect of chitosan doses and nitrogen sources on the growth, yield and seed quality of cowpea. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 115-121, Apr. 2012.

EL-TARABILY, K. A. et al. Isolation and characterization of sulfur-bacteria, including strains of *Rhizobium* from calcareous soils and their effects on nutrient uptake and growth of maize (*Zea mays* L.). **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, n.1, p. 101-111, Jan. 2006.

EMBRAPA Solos. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília, DF: EMBRAPA Solos, 2009. 627 p.

FAROUK, S.; AMANY, A. R. Improving growth and yield of cowpea by foliar application of chitosan under water stress. **Egyptian Journal of Biology**, v. 14, p. 14-26, 2012.

FRANCO, L. O. et al. *Cunninghamella elegans* (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Analytica**, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 40- 44, 2005.

FRANCO, L. O et al. Avaliação da atividade ácida e alcalina e acúmulo de fosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*. **Analytica**, São Paulo, v. 54, p. 70-78, 2011.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão – caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2005. 519 p.

FREIRE FILHO, F. R. et al. **Feijão – caupi: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Brasília: EMBRAPA Informação Tecnológica, 2011. 81 p.

GISMONTI. Na sala com Gismonti. **Os nutrientes das plantas (3) - Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Enxofre (S)**. 2009. Disponível em: <http://agronomiacomgismonti.blogspot.com.br/2009/05/os-nutrientes-das-plantas-3-calcio-ca.html>. Acesso em: 14-02-2017.

GROSS, E.; CORDEIRO, L.; CAETANO, F. H. Ultrastructural study of ectomycorrhizas on Pinus. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 95-101, Jan./Mar. 2004.

GUAN, Y. et al. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. **Journal of Zhejiang University Science B**, Zhejiang, v. 10, n. 6, 427-433, 2009.

GUARÇONI, A. M.; MENDONÇA, E. S. Capacidade tampão de pH do solo e disponibilidade de fósforo pela adição de composto orgânico. **Magistra**, Belo Horizonte, v. 15, p. 1-7, 2003.

IPA – INSTITUTO AGRONÔMICO DE PERNAMBUCO. **Recomendações de Adubação para o Estado de Pernambuco** (2ª aproximação). 3ª ed. Recife: Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária, 2008. 212 p.

LIMA, R. C. M. et al. Rendimento da alface e atributos químicos de um Latossolo em função da aplicação de biofertilizantes de rochas com fósforo e potássio. **Brazilian Journal of Horticulture**, Vitória da Conquista, v. 25, n. 2, p. 224-229, 2007.

LIMA, F. S. et al. Earthworm compound and rock biofertilizer enriched in nitrogen by inoculation with free living diazotrophic bacteria. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1769-1777, 2010.

MALAVOLTA, E. **ABC da Adubação**. 4ª ed. São Paulo: Editora Agronomia Ceres, 1979. 255 p.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. New York: Academic Press, 1995. 874 p.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2002. 625 p.

NAEEM, M.; A. HASSAN, M. A. A.; EL-SAYED. A. H. Radiation-induced degradation of chitosan for possible use as a growth promoter in agricultural purposes. **Carbohydrates Polymers**, v. 79, n. 3, p. 555-562, Feb. 2010.

OLIVEIRA, W. S. et al. Interactive microbial processes for improvement of melon yield and nutrients availability in soil of the semiarid region. **Australian Journal of Crop Science**, v. 8, n. 7, p. 1124-1130, 2017.

OLIVEIRA, W. S. et al. The impact of biofertilizers with diazotrophic bacteria and fungi chitosan on melon characteristics and nutrient uptake as an alternative for conventional fertilizers. **Journal of Scientia Horticulturae**, v. 209, n. 19, p. 236-240, Sep. 2016.

PEREIRA, R. F. et al. Estudo do efeito de diferentes dosagens de biofertilizante e de intervalos de aplicação sobre a produção do maracujazeiro-amarelo. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, supl. esp. n.1, p.25-30, 2009.

_____. Crescimento e rendimento de feijão *vigna* submetido à adubação orgânica. **Revista Verde**, Mossoró, v. 8, n. 3, p. 91 - 96, 2013.

RUAN, J.; WU, X.; HARDTER, R. Effects of potassium and magnesium nutrition on the quality components of diffents types of tea. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 1, p. 47-52, Jan. 1999.

SANCHEZ, P. A. Soil fertily and hunger in Africa. **Science**, Washington, v. 295, n. 5562, p. 2019-2020, 2002.

SANTANA, C. T. C. et al. Desempenho de cultivares de alface americana em resposta a diferentes doses de torta de filtro. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 1, p. 22-29, 2012.

SANTOS, C. E. R. S. et al. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. Parte I – Fixação biológica do N₂. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. (Eds.). **Microrganismos de agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: AGROLIVROS, 2008. p. 17 – 42.

SANTOS, D. H. et al. Sugarcane yield under mud cake addition enriched with soluble phosphate. **Tropical Agricultural Research**, Goiânia, v. 40, n. 4, p. 454-461, 2010.

SHEIKHA, S. A.; AL-MALKI, F. M. Growth and chlorophyll responses of bean plants to chitosan applications. **European Journal of Scientific Research**, v. 50, n. 1, 124-134, 2011.

SILVA, E. V. N. **Eficiência de biofertilizante de rochas e matéria orgânica com adição de quitosana fúngica na cultura da banana**. 2016. 148 f. Tese (Doutorado em Agronomia - Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Recife, 2016.

SILVA, E. V. N. et al. Rizóbios e fungo micorrízico arbuscular inoculados em leucena com aplicação de biofertilizantes PK mais enxofre e *Acidithiobacillus*. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v. 17, n. único, p. 66-72, Jan./Dec. 2012.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC/ABEAS/ESAL/FAEPE, 1988. 236 p.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. (Eds.). **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora da UFLA, 2002. p. 305-329.

SOBRAL, M. F. **Fontes de matéria orgânica e seus efeitos na severidade da murcha-de-fusário do caupi**. 2008. 59 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2008.

SOUZA, V. C. et al. Estudos sobre fungos micorrízicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 10, n. 3, p. 34-43, 2006.

STAMFORD, N. P. et al. Biofertilizante de rocha fosfatada com *Acidithiobacillus* como adubação alternativa de caupi em solo com baixo teor de P disponível. **Analytica**, São Paulo, v. 9, p. 48-53, Feb./Mar. 2004.

_____. Effects of rock phosphate, sulphur with and without *Acidithiobacillus* and organic by-products on mimosa (*Mimosa caesalpiniiifolia*) grown in a Brazilian tableland soil. **Tropical Grasslands**, Cali, v. 39, 54-61, 2005.

_____. Rock biofertilizers with *Acidithiobacillus* on sugarcane yield and nutrient uptake in a Brazilian soil. **Geomicrobiology Journal**, v. 23, n. 5, p. 261-265, 2006.

_____. Biofertilizantes de rochas fosfatadas e potássicas com enxofre e *Acidithiobacillus*. **Microrganismos e Agrobiodiversidade o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. p. 401-421.

_____. Effectiveness of phosphate and potash rocks with *Acidithiobacillus* on sugar cane yield and their effects in soil chemical attributes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 2061-2066, Oct. 2008.

_____. Chemical attributes of an Argisol of the Vale do São Francisco after melon growth with phosphate and potash rocks biofertilizers. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 27, n. 4, p. 447- 452, Dec. 2009.

_____. Rock biofertilizers and earthworm compost on sugarcane and soil attributes in two consecutive years. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 73, n. 1, p. 29-33, Jan./Feb.2016.

_____. Characterization and inhibitory activity of chitosan on hyphae growth and morphology of *Botrytis cinerea* plant pathogen. **International Journal of Applied Research in Natural Products**, Texas, v. 7, n. 4, p. 31-38, 2014.

TEDESCO, M. J. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174 p.

TRABULSI L. R.; ALTERTHUM F. **Microbiologia**, 4^a ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 535 p.

XAVIER, G. R. et al. Variabilidade genética em acessos de caupi analisada por meio de marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005.

XU, G.; WOLF, S.; KAFKAFI, U. Ammonium on potassium interaction in sweet pepper. **Journal of Plant Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 719-734, 2002.