

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**  
**Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade**

**Tese**



**Controle biológico do cretamento bacteriano comum pela pulverização de  
folhas, flores e microbiolização das sementes de feijão com bactérias**

**Maurício Sangiogo**

**Pelotas, 2019**

**Maurício Sangiogo**

**Controle biológico do crescimento bacteriano comum pela pulverização de folhas, flores e microbiolização das sementes de feijão com bactérias**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Fitossanidade.

Orientador: Dra. Andrea Bittencourt Moura

Co-Orientador (es): Dr. Ismail Teodoro de Souza Junior  
Dr. Irajá Ferreira Antunes

Pelotas, 2019

**Maurício Sangiogo**

**Controle biológico do cretamento bacteriano comum pela pulverização de folhas, flores e microbiolização das sementes de feijão com bactérias**

**Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Fitossanidade, Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.**

**Data da Defesa: 27/08/2019**

**Banca examinadora:**

.....  
**Prof(a). Dra Andrea Bittencourt Moura (Orientadora)**  
**Doutora em Agronomia (Fitopatologia) pela Universidade Federal de Viçosa (UFV).**

.....  
**Prof(a). Dra. Cândida Renata Jacobsen de Farias**  
**Doutora em Fitossanidade (Fitopatologia) pela Universidade Federal de Pelotas (UFPEl).**

.....  
**Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira**  
**Doutora em Fitotecnia (Fitopatologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).**

.....  
**Dr.Dr. Ismail Teodoro de Souza Junior**  
**Doutor Fitotecnia (Fitopatologia) pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).**

.....  
**Prof. Dr. Jeronimo Vieira de Araujo Filho**  
**Doutor em Ciências (Fitopatologia) pela Universidade de São Paulo (USP).**

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, João e Jacinta, por sempre me apoiarem e incentivarem a alcançar meus objetivos.

A minha esposa, Caroline, por sempre estar ao meu lado e me incentivar nos momentos difíceis.

A minha orientadora, Andrea, por me orientar e dar condições da realização desse trabalho.

Ao meu coorientador, Ismail, por me orientar e auxiliar na elaboração desse trabalho.

Ao meu coorientador, Irajá Ferreira Antunes, pelas contribuições para a realização desse trabalho.

Ao Professor Marcos Baccarin, por auxiliar na elaboração desse trabalho, disponibilizando seu espaço em casa de vegetação para montagem dos experimentos.

Ao Professor Ricardo Magela de Souza, da Universidade Federal de Lavras, por fornecer lotes de sementes de feijão transportando naturalmente o agente causal do crestamento bacteriano comum.

Aos colegas de laboratório, Julia, Bruna, Renata, Rosana e estagiários Fernando e Flávia, por auxiliarem nas atividades de laboratório.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), por fornecer bolsa de doutorado, viabilizando a realização desse trabalho.

E a Deus, por ter me concedido o privilégio de alcançar meus objetivos.

Obrigado.

## Resumo

SANGIOGO, Mauricio. **Controle biológico do crestamento bacteriano comum pela pulverização de folhas, flores e microbiolização das sementes de feijão com bactérias**. Orientadora: Andrea Bittencourt Moura. 2019. 84 f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

O Crestamento Bacteriano Comum (CBC), causado por *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF) e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP), é uma das principais doenças do feijão. Existe uma carência de métodos eficientes para seu controle, assim, é importante o desenvolvimento de novas técnicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a pulverização de folhas e flores, e a microbiolização das sementes com bactérias para o controle do CBC. Os tratamentos bicontroladores utilizados foram previamente selecionados: DFs513 (*Pseudomonas veronii*), DFs769 (*Bacillus cereus*), combinação C03 [DFs348 (*B. cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)], e comparados à testemunha (água). Foi estudado o efeito do intervalo de tempo (2, 4, 6, 8 e 10 dias) entre a pulverização foliar dos biocontroladores e a inoculação de XFF, verificando-se que não houve efeito do intervalo de tempo na incidência, porém quando se avaliou o efeito cumulativo (área abaixo da curva de progresso da severidade – AACPS) intervalos inferiores a oito dias resultaram em maior controle do CBC. A avaliação do número (1, 2 ou 3) de aplicações foliares mostrou não haver efeito de pulverizações adicionais no controle do CBC. No estudo da pulverização foliar de líquido metabólito (obtido do sobrenadante de cultivo dos biocontroladores), observou-se que, com exceção do isolado DFs348 (quando utilizado morto), todos tratamentos reduziram significativamente a AACPS, não diferindo do indutor de resistência (quitina). Considerando-se que o líquido metabólico não inibiu o patógeno *in vitro*, entende-se que esses isolados atuaram induzindo resistência. Adicionalmente, foi detectada a presença dos genes responsáveis pela produção de vários compostos antimicrobianos e, portanto, não se exclui a possibilidade de ocorrer também a antibiose. Também foi estudado o efeito dos biocontroladores pulverizados durante a floração ou para tratamento de sementes naturalmente transportando XFF e/ou XAP. Em ambos os casos, foram avaliados o número de sementes transportando o patógeno (determinado pela técnica do número mais provável a partir de 550 sementes cujos extratos foram inoculados em vagens ou semeados em meio GYCA) e a população bacteriana (extração a partir de 500 sementes, plaqueamento do extrato em meio GYCA e contagem das unidades formadoras de colônias), bem como a transmissão deste para as sementes e/ou da semente para a plântula originada (casa de vegetação usando vermiculita esterilizada). Neste estudo, o tratamento DFs769 destacou-se em todas as avaliações tanto no tratamento de sementes quanto em pulverizações, embora a combinação C03 tenha reduzido a transmissão. De uma maneira geral, o tratamento DFs769 (*B. cereus*) se destacou por apresentar os melhores resultados em todos experimentos, apresentando potencial para uso no controle biológico do CBC tanto por proteção das folhas, como na produção de sementes sadias e tratamento de sementes transportando o patógeno.

Palavras-chave: *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Período de proteção. Líquido metabólico. Produção de sementes.

## Abstract

SANGIOGO, Mauricio. **Biological control of common bacterial blight of bean by spraying leaves, flowers and microbiolization of bean seeds with bacteria.** Advisor: Andrea Bittencourt Moura. 2019. 84 f. Thesis (Doctorate in plant protection) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Common bacterial blight (CBB), caused by *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF) and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP), is considered one of the major diseases affecting common bean crop. There is a lack of effective control methods for this disease, so the development of more efficient techniques is important. The aim of this study was to evaluate the spraying of leaves and flowers, and microbiolization of bean seeds with bacteria to control CBB. The biocontroller treatments used were previously selected: DFs513 (*Pseudomonas veronii*), DFs769 (*Bacillus cereus*), combination C03 [DFs348 (*B. cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)] and compared to the control (water). We studied the effect of the time interval (2, 4, 6, 8 and 10 days) between biocontrollers leaf spraying and XFF inoculation, and it was found that there is no time interval effect on the incidence, however, when the cumulative effect (area under severity progress curve - AUSPC) was evaluated, intervals of less than eight days resulted in greater control of CBB. The evaluation of the number (1, 2 or 3) of foliar applications showed no effect of additional spraying on CBB control. In the study of foliar spraying of metabolite liquid (obtained from biocontrollers' supernatant), it was found that, except for the DFs348 isolate (when used dead), all treatments showed a significant reduction in AUSPC, not differing from the resistance inductor (chitin). Considering the fact that the metabolic fluid of these isolates did not inhibit the pathogen *in vitro*, it is understood that these act by resistance induction. Additionally, were detected the presence of the genes responsible for the production of various microbial compounds, therefore, does not exclude the possibility of also occurring antibiosis. The effect of biocontrollers when sprayed during flowering or in the treatment of seeds naturally carrying XFF and/or XAP was also studied. In both cases, the number of seeds carrying the pathogen (determined by the technique of the most probable number, using 500 seeds whose extracts were inoculated in pods or spread in GYCA medium) and the bacterial population (extraction from 500 seeds, plating extract in GYCA medium and counting colony forming units), as well as its transmission to the seeds and/or from seeds to seedlings. In this study, the DFs769 treatment stood out in all evaluations in both seed treatment and spraying, although the C03 combination also reduced pathogen transmission. In general, DFs769 treatment stood out in all evaluations in both seed and spraying treatment, for presenting the best results in all the experiments, showing potential for the use in the CBB biological control, in both for leaf protection and for the production of healthy seeds and treatment of seeds carrying the pathogen.

Keywords: *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*. *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Protection period. Bacterial supernatant. Seed production.

## Sumário

<b>1 Introdução geral</b> .....	8
<b>2 Capítulo 1 – Controle biológico do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro por pulverizações foliares: Estudo do período de proteção, número de aplicações adicionais e da aplicação do líquido metabólico produzido pelos biocontroladores</b> .....	18
<b>2.1 Introdução</b> .....	18
<b>2.2 Material e métodos</b> .....	21
<b>2.2.1 Microrganismos utilizados e sua manutenção</b> .....	21
<b>2.2.2 Preparo das suspensões de bactérias</b> .....	22
<b>2.2.3 Pulverização dos tratamentos biocontroladores, inoculação do patógeno e avaliações</b> .....	22
<b>2.2.5 Ensaio I: Determinação do período de proteção proporcionado pelos tratamentos biocontroladores</b> .....	24
<b>2.2.6 Ensaio II: Efeito cumulativo de pulverizações adicionais de biocontroladores no controle do CBC</b> .....	24
<b>2.2.8 Análises estatísticas dos dados</b> .....	29
<b>2.3 Resultados e Discussão</b> .....	30
<b>2.4 Conclusões</b> .....	45
<b>3 Capítulo 2 – Tratamento de sementes e proteção de flores pela pulverização de bactérias biocontroladoras reduz a transmissão de <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> em sementes e plântulas de feijão</b> .....	47
<b>3.1 Introdução</b> .....	47
<b>3.2 Material e métodos</b> .....	50
<b>3.2.1 Microrganismos utilizados e sua manutenção</b> .....	50
<b>3.2.2 Experimento I: Efeito do tratamento de sementes naturalmente transportando <i>Xanthomonas fuscans</i> subsp. <i>fuscans</i> e/ou <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseole</i> com bactérias biocontroladoras</b> .....	51
<b>3.2.3 Experimento II: Efeito da pulverização de bactérias biocontroladoras em plantas de feijão em floração na transmissão de XFF para as sementes e sua transmissão para plântulas</b> .....	54
<b>3.2.4 Experimento III: Efeito da pulverização foliar em campo com ocorrência natural de Crestamento Bacteriano Comum na sanidade de sementes de feijão</b> .....	55

<b>3.2.5 Análises estatísticas dos dados</b> .....	56
<b>3.3 Resultados e Discussão</b> .....	56
<b>4 Considerações finais</b> .....	67
<b>Referências</b> .....	69
<b>Anexos</b> .....	82



## 1 Introdução geral

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) tem grande importância no Brasil, além de constituir-se em um alimento básico para a população brasileira, é considerado um produto de alta importância econômico e social, pois cerca de 70% da produção é oriunda de pequenas propriedades rurais (BRASIL, 2015). Na safra 2018/2019, estima-se uma produção total de 3,07 milhões de toneladas em uma área de 2,98 milhões de hectares. O consumo de feijão estimado para 2018/2019 é de 3,05 milhões de t. Nota-se que o mercado interno praticamente absorve toda produção de feijão nacional, havendo ainda necessidade de importação em determinados períodos, visto que nem todo feijão produzido vai para o mercado interno, pois parte permanece em estoque e para exportação. Na safra 2018/2019, a média de rendimento para a cultura do feijão no país, estimada em maio de 2019, foi de apenas 1042 kg ha<sup>-1</sup> (COMPANHIA NACIONAL E ABASTECIMENTO - CONAB, 2019a; CONAB 2019b), enquanto o potencial produtivo da maioria das cultivares existentes no mercado é maior que 4000 kg ha<sup>-1</sup> (GUERRA; SILVA; RODRIGUES, 2000). A discrepância entre o potencial produtivo e a produtividade real é muito grande. Mesmo para a produtividade média do Rio Grande do Sul (1721 kg ha<sup>-1</sup>) a maior do país (CONAB, 2019a), ainda assim é considerada a produtividade como baixa. Essa grande diferença entre o potencial produtivo da cultura e a produtividade real de campo se dá, dentre outros motivos, devido à alta sensibilidade dessa cultura a eventos climáticos e as doenças (COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO – CTSBF, 2012). Em relação ao clima, com exceção da irrigação, são poucas as medidas que podem ser tomadas, porém em relação às doenças, a margem de atuação é maior.

Dentre as doenças do feijão, o crestamento bacteriano comum (CBC) incitado pelas bactérias *Xanthomonas axonopodis* sp. *phaseoli* (XAP) e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF), é considerada uma das doenças de maior importância na cultura, devido à sua ampla distribuição nas áreas de cultivo, à dificuldade de seu controle e ao seu potencial de dano (SARTORATO; RAVA; RIOS, 1996; VALE; COSTA; ZAMBOLIM, 1997). De acordo com Rava e Sartorato (1994), em condições favoráveis, as perdas em produtividade ocasionadas por esses patógenos podem chegar a 70%. Estimativas de reduções em produtividade ocasionadas pela doença no país estão entre 4,8% e 40,7%, variando em função do grau de resistência genética dos genótipos (WENDLAND *et al.*, 2010), no exterior, reduções em produtividade superiores a 40% também têm sido registradas (SINGH; MIKLAS, 2015).

A bactéria *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, que possui a capacidade de produzir melanina *in vitro*, chegou a ser considerada uma variante de *Xanthomonas axonopodis* sp. *phaseoli* (BURKHOLDER; BULLARD, 1946). No entanto, trabalhos recentes têm demonstrado que XAP e XFF diferem filogeneticamente entre si. De Paiva e colaboradores (2018), demonstraram que a XAP tem maior identidade genética com outras espécies de *Xanthomonas* (não patogênicas ao feijão) do que com XFF, no entanto, se observa que as diferenças genéticas encontradas não constituem diferenças patogênicas, pois as duas espécies não podem ser diferenciadas em relação à sintomatologia.

XAP e XFF apresentam forma de bastonete reto, sendo classificadas como Gram-negativas, estritamente aeróbicas e móveis por um flagelo polar (RAVA; SARTORATO, 1994). As colônias são geralmente, brilhantes, viscosas, de bordos lisos, com coloração amarela intensa, devido à produção de pigmentos conhecidos como xantomonadinas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005). XAP e XFF são patógenos de clima quente e úmido, temperatura de 28°C a 32°C, alta umidade relativa do ar e chuvas frequente favorecem o desenvolvimento da doença (CTSBF, 2012). O tempo entre a infecção inicial e a disseminação secundária ocorre em torno de 10 a 14 dias (SAETTLER, 1991). A sobrevivência do patógeno na ausência do hospedeiro, pode ser em restos culturais, em sementes transportando o patógeno e hospedeiros secundários, servindo todos estes como fonte de inóculo primário (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; KARAVINA *et al.*, 2011; SCHAAD, 1982; TORRES; MARINGONI; SILVA, 2009).

Tanto XFF como XAP sobrevivem como epífitas no mesófilo foliar de folhas de feijão, embora dificilmente ocorra aumento da população de bactérias em epifitismo, essa é uma importante fase em que o patógeno sobrevive na superfície do hospedeiro até que o mesmo possa penetrar na planta através de estômatos, hidatódios ou ferimentos (RUDOLPH, 1993). Segundo Weller e Saettler (1980), o patógeno pode sobreviver tanto epifiticamente como endofiticamente no hospedeiro. Esse período de epifitismo e de endofitismo, sem causar sintomas, possui um importante papel epidemiológico, pois o patógeno pode permanecer no hospedeiro até que as condições ambientais sejam favoráveis ao desenvolvimento da doença. A população epifítica de XFF e XAP se divide em duas frações, populações de células bacterianas solitárias e em biofilme (BEATTIE; LINDOW, 1995). Jacques e colaboradores (2005) estudaram a dinâmica de populações de XFF em superfícies de plantas de feijão em condições de campo, segundo os autores, populações do patógeno formando biofilme não foram afetadas pelo estresse hídrico, por outro lado populações de células solitárias sofreram drástica redução de população, porém retomadas as condições favoráveis, a população de células solitárias voltaram a crescer.

Após infecção da planta, XFF ou XAP podem desenvolver uma infecção sistêmica, e através do sistema vascular redistribuir o patógeno na planta, podendo o mesmo vir a penetrar as vagens através do sistema vascular e infectar as semente através do funículo ou pelo micrópilo, confinando-se na maioria das vezes no tegumento da semente. A penetração direta do patógeno em sementes através do tegumento não tem sido observada, podendo ocorrer à infestação das sementes (superfície das sementes), em caso do desenvolvimento de lesões em vagens (ZAUMEYER; THOMAS, 1957). A bactéria pode localizar-se no interior, na superfície, bem como acompanhando as sementes (SCHUSTER; COYNE, 1974; ZAUMEYER; THOMAS, 1957).

Percebe-se que a semente é o principal meio de sobrevivência e disseminação do patógeno. Nesse sentido, Wallen e Sutton (1965), verificaram que 0,5% de sementes infectadas foram suficientes para ocorrência de epidemia da doença, no Canadá. Em Uganda, Opio (1993) verificou que 0,2% de sementes infectadas foram suficientes para ocasionar severas epidemias. No Brasil, o Grupo Técnico Permanente em Patologia de Sementes, estabeleceu o nível de tolerância de 0% de para o agente causal do CBC, ou seja, lotes de sementes de feijão

deveriam estar livres do patógeno (HENNING, 2004). No entanto, é importante ressaltar que a simples presença do patógeno na semente não é o suficiente para o sucesso da infecção da planta, é necessária uma população mínima do patógeno para a ocorrência da doença. Estudos têm indicado que a população mínima do agente causal do CBC para iniciar a infecção na planta varia de  $10^2$  a  $10^3$  UFC/semente, variando conforme as condições de temperatura e umidade do ambiente (OPIO; TERI. ALLEN, 1993; DARRASSE *et al.*, 2007).

A ocorrência de XAP e XFF infectando ou infestando sementes de feijão já é bem conhecida no Brasil. Ito e colaboradores (1997) detectaram a presença do patógeno em 5,3% (1991) e 30,6% (1993) dos lotes de sementes produzidas no estado de São Paulo. Ainda em São Paulo, Valarini e Spadotto (1995) detectaram o agente causal do CBC em 8% das amostras analisadas, em lotes de sementes fiscalizadas/certificadas, safra de 1992/93. No estado do Paraná, segundo Torres, Maringoni e Silva (2009), 50% dos lotes de sementes foram portadores de XAP com incidência de 0,1% a 1,7%.

Dada a importância da semente como principal meio de disseminação do CBC, os testes de sanidade de sementes tem um papel fundamental no monitoramento e controle de lotes de sementes de feijão. Segundo Cafati e Saettler (1980), sementes de feijão transportando o patógeno podem ser assintomáticas, o que dificulta ainda mais a detecção da ocorrência do mesmo, justificando o uso de técnicas adequadas na detecção do patógeno.

Existem várias técnicas de detecção de fitobactérias em sementes, destacando-se, o cultivo de sementes em meio semi-sólido, o semeio de extrato de sementes em meios seletivos ou semi-seletivos, o plantio direto das sementes em substrato esterilizado, a inoculação de extrato de sementes em plantas suscetíveis, Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), métodos moleculares baseados na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), imunofluorescência, uso de bacteriófagos, entre outros (GITAITIS; WALCOTT, 2007; SAETTLER; SCHAAD; ROTH, 1989). O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Manual de Análise Sanitária de Sementes, indica como método padrão para detecção de XFF e XAP, o semeio de extrato de sementes em meios semi-seletivos, detecção por PCR e por inoculação em hospedeiro susceptível (BRASIL, 2009). Os métodos indicados pelo MAPA, nos fornecem um resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) da amostras, porém não permitem estimar o número de sementes

transportando o patógeno. Assim, a metodologia para detecção de XFF e XAP proposta por Valarini e Menten (1992) torna-se uma técnica interessante, uma vez que esse método, combinando as técnicas de semeio de extrato de sementes em meio semi-seletivo e inoculação em hospedeiro susceptível, fornecem uma estimativa do Número Mais Provável (NMP) de sementes portadoras do patógeno na amostra.

As metodologias propostas pelo MAPA e por Valarini e Menten (1992), não fornecem informações sobre a transmissão do patógeno das sementes para as plântulas. Nesse sentido, a técnica do plantio direto das sementes em substrato esterilizado é a única técnica capaz de fornecer resultados quanto à transmissão do patógeno para as plântulas oriundas de sementes transportando o patógeno, sendo um importante método quando se deseja conhecer essa informação, visto que a presença do patógeno nas sementes não garante o sucesso de infecção das plantas resultantes, visto existir a necessidade de uma população mínima do patógeno.

Por tratar-se de uma doença bacteriana, as medidas de controle do CBC são limitadas, em especial o controle químico por ser economicamente inviável e ineficiente, sendo a maioria das medidas de controle recomendadas de caráter preventivo (MOURA; CORRÊA; DENARDIN, 2009). Atualmente não se tem cultivares de feijão comum com resistência total ao CBC e os métodos de controle físico ou culturais são restritos, limitando-se ao controle da irrigação e do tráfego de máquinas a fim de diminuir a disseminação do patógeno dentro da área.

O fato de XAP e XFF serem disseminadas via sementes, aliado à alta taxa de utilização de sementes sem nenhum controle de qualidade sanitária, como na safra 2017/2018 cuja taxa de utilização de sementes salvas ou piratas nas lavouras de feijão foi de 80% e 97%, no Brasil e no Rio Grande do Sul, respectivamente, tornam a semente um fator crucial no controle preventivo do CBC (ABRASEM, 2016). Adicionalmente, o tratamento de sementes com antibióticos não tem a capacidade de eliminar o patógeno que está infectando a semente, agindo apenas na desinfestação da mesma, não sendo uma prática usual dado ao elevado custo e à baixa eficiência (AGROFIT, 2019).

Dada à importância do CBC e a escassez de métodos de controle efetivos, surge a necessidade de buscar métodos mais eficientes, que ofereçam uma alternativa no controle do CBC e na produção de sementes livres do patógeno, seja por tratamento de sementes, ou por proteção da planta mãe, uma vez que as

sementes são a principal via de sobrevivência e disseminação do patógeno. Dentre os métodos mais promissores, em alternativa ao tradicional controle químico, está o controle biológico.

Na cultura do feijão, o controle biológico tem sido estudado no manejo de várias doenças da parte aérea (BARDAS *et al.*, 2009; CENTURION; KIMATI, 1994; CORRÊA *et al.*, 2008; CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014; GARCIA, 2008; GARRET; SCHAWRTZ, 1998; MARTINS *et al.*, 2013; MIZUBUTI *et al.*, 1995; VIEIRA-JÚNIOR, 2005), das raízes e caules (AHMADZADEH; TEHRANI, 2009; HUANG *et al.*, 2000; KHUN, 2007; MARTINS *et al.*, 2003) e, inclusive no controle do CBC (CORRÊA, 2007; SANGIOGO *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2009; VIEIRA-JÚNIOR, 2005; ZANATTA *et al.*, 2007).

O Grupo de Pesquisa “Bactérias Biocontroladoras e Promotoras do Crescimento Vegetal”, coordenado pela Universidade Federal de Pelotas, selecionou bactérias biocontroladoras eficientes quando utilizadas individualmente ou em combinação para microbiolizar sementes de feijão, controlando o CBC (ZANATTA, 2004; SILVA, 2004; CORRÊA, 2007; CORRÊA *et al.*, 2017). Posteriormente, o grupo identificou que essas bactérias, quando utilizadas em combinação, aumentavam a efetividade do controle do CBC (SANTOS, 2006), bem como ampliavam seu espectro de ação, passando a controlar também a mancha angular, antracnose, podridão cinzenta, murcha de *curtobactérium*, murcha de *fusárium* (CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014) e nematoide das galhas (CORRÊA *et al.*, 2012). Também foi estabelecido que essas bactérias selecionadas, quando usadas para microbiolizar as sementes, podem atuar por diferentes mecanismos de ação como antibiose, competição (CORRÊA, 2010) e indução de resistência (SANGIOGO *et al.*, 2018).

Recentemente, foram realizados ensaios mostrando o potencial do uso dessas mesmas bactérias biocontroladoras, tanto isoladas quanto combinadas, para pulverização foliar, visando o controle do CBC (SANGIOGO *et al.*, 2018). A aplicação dessas bactérias biocontroladoras por pulverização é uma estratégia interessante no manejo do CBC, uma vez que nem sempre o produtor tem a disponibilidade do biocontrolador no momento do plantio, podendo a pulverização foliar ser feita em caráter curativo, bem como ser realizada em qualquer momento ao longo do ciclo da cultura, e se necessário, repetida quantas vezes for necessário. Além disso, considerando a antibiose e competição como mecanismos de controle, o

sucesso da metodologia de aplicação através da deposição foliar do biocontrolador é mais provável, uma vez que XAP e XFF ocorre predominantemente em folhas, hastes e vagens. A aplicação do biocontrolador por pulverização das folhas tem se mostrado eficiente no controle de doenças em diferentes culturas, como no algodão (KAPADIYA; BUTANI; KHANPARA, 2015), arroz (SHINDE; PRASHANTHI; KRISHNARAJ, 2014) e inclusive na cultura do feijão (GARCIA; ROMEIRO, 2011). Porém, até o momento, as informações quanto ao período de proteção proporcionado por esses biocontroladores são restritas, dado esse importante para se estabelecer o intervalo ideal entre aplicações do patógeno, bem como o efeito de aplicações adicionais do biocontrolador na cultura.

Adicionalmente ao uso de biocontroladores por aplicação direta ao alvo, tem-se a possibilidade do uso do líquido metabólico produzido pelos biocontroladores no controle de patógenos. A eficácia dessa estratégia de controle tem sido relatada com frequência na literatura (KÄLVÖ; MENKIS; BROBERG, 2018; YONGGANG *et al.*, 2019). O líquido metabólico, para fins de aplicações na planta hospedeira, é obtido por meio do crescimento do biocontrolador em meio de cultura líquido, sendo após determinado período de crescimento realizada a separação das células bacterianas do meio líquido (centrifugação e filtração), e utilização do sobrenadante ou filtrado, o qual contém os metabólicos secundários produzidos pelas bactérias. O líquido metabólico produzido pode atuar no controle da doença pela atividade antimicrobiana direta sobre o patógeno, devido à presença de antibióticos entre outras substâncias com atividade antimicrobiana, ou por indução de resistência, elicitada por substâncias presentes no líquido metabólico (AKRAM; ANJUM; ALI, 2015; YONGGANG *et al.*, 2019).

A indução de resistência de plantas contra patógenos tem sido cada vez mais estudada. É possível ativar os mecanismos de defesa em plantas após sua exposição a um agente indutor, não só localmente como em toda a planta. Plantas sob o ataque de patógenos sintetizam um conjunto de proteínas relacionadas a defesa, sendo o papel da indução de resistência proporcionar o aumento da expressão dessas proteínas e/ou fazê-la de forma mais rápida quando na presença do patógeno (VAN LOON *et al.*, 1997). A indução de resistência foi demonstrada em diversas espécies de plantas, ocorrendo em resposta ao tratamento com elicitores, bióticos ou abióticos, dentre eles, os óleos essenciais (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002), os extratos vegetais (SILVA;

PASCHOLATI; BEDENDO, 2007), produtos químicos (VIGO et al., 2012), microrganismos (PIETERSE, et al., 2014) e líquido metabólico de microrganismos (AKRAM; ANJUM; ALI, 2015).

A indução de resistência em plantas pode ocorrer na forma de duas rotas distintas, no entanto com resultado final semelhante, sendo denominadas de ISR (*Induced Systemic Resistance*) e SAR (*Systemic Acquired Resistance*). A grande vantagem da indução de resistência em plantas está na sua sistematicidade, podendo chegar a locais muitas vezes fora do alcance de outros meios de controle (pulverizações), e na sua inespecificidade, podendo agir sobre um grande número de patógenos (ROMEIRO, 2007). Assim, bactérias biocontroladoras são usadas como elicitores bióticos desencadeando a resistência sistêmica induzida, conhecida como ISR. Embora o líquido metabólico de microrganismos biocontroladores não contenha as células microbianas, o mesmo está relacionado a indução de resistência do tipo ISR, por conter substâncias produzidas pelo microrganismo que podem atuar como elicitores (AKRAM; ANJUM; ALI, 2015).

Em trabalhos anteriores, foi comprovado que ostratamentosbiocontroladores DFs513, DFs769 e a combinação C03 (DFs348 + DFs769 + DFs831) foram capazes de controlar o CBC quando aplicado via pulverização foliar pelo mecanismo de indução de resistência (SANGIOGO et al., 2018), no entanto, é necessário esclarecer a existência de outros mecanismo de ação além da indução de resistência. Os modos de ação mais conhecidos são a antibiose, a competição, o parasitismo e a indução de resistência. É possível que mais de um mecanismo de ação esteja envolvido, resultando no controle da doença (BETTIOL, 1991). Portanto, o conhecimento dos mecanismos de ação pelos quais este controle se dá é essencial para a maximização deste.

Adicionalmente ao controle via aplicações foliares, outra estratégia interessante de controle é a produção de sementes saudias, ou quando as mesmas já estiverem transportando o patógeno, métodos de tratamento das mesmas. Fessehaie e Walcott (2005) realizaram estudo em que a aplicação de biocontroladores realizada nas flores de melancia, reduziu a incidência do patógeno *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* nas sementes produzidas pelas plantas tratadas. Essa é uma estratégia de controle interessante, em que por meio do tratamento das plantas mãe se produz sementes saudias, estratégia que poderia ser adotada nos campos de produção de sementes. Atualmente não existe nenhum estudo



semelhante para a cultura do feijão, sendo assim, é de grande importância estudos que avaliem essa estratégia para o controle do CBC.

Além disso, o controle biológico via tratamento de sementes é amplamente utilizado, havendo vários trabalhos na literatura comprovando efeito significativo nesse método de aplicação do biocontrolador (CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014; GOWTHAM *et al.*, 2018; NASU *et al.*, 2018). No entanto, o efeito do tratamento de sementes com os isolados biocontroladores previamente selecionados pelo grupo de pesquisa supracitado no controle do CBC em sementes de feijão transportando o patógeno ainda não foi testado pelo grupo.

Em termos de controle de doenças podemos pensar em dois momentos de intervenção, o controle preventivo e o controle curativo. O controle preventivo se baseia na prevenção, procurando evitar o problema, se adiantar em relação ao patógeno, de maneira que a doença não chegue a ocorrer. Pensando em controle biológico, a aplicação de biocontroladores via tratamento de sementes, se enquadra no controle preventivo, visando evitar a introdução do patógeno na área. Também se enquadra nessa categoria a estratégia da produção de sementes sadias pela aplicação dos biocontroladores nas plantas mãe, e aplicações foliares do biocontrolador quando anterior à entrada do patógeno. Já o controle curativo, busca remediar um problema já existente na área, o patógeno já se faz presente na planta e é provável que já tenha causado algum dano a mesma, assim procura-se um meio de controlar o patógeno que já está infectando a planta. No controle biológico de doenças de parte aérea, se enquadra nessa categoria a pulverização aérea de biocontroladores. Embora o controle preventivo seja preferível, a possibilidade do controle curativo é importante, dando a possibilidade do uso do controle biológico em qualquer momento do ciclo vegetativo e reprodutivo da cultura no campo bem como a possibilidade de novas aplicações sempre que necessário. Em trabalhos anteriores os isolados DFs513, DFs769 e C03 mostraram efeito tanto preventivo quanto curativo no controle do CBC, quando aplicados via pulverização foliar, mostrando seu potencial no controle do patógeno em ambas situações (SANGIOGO *et al.*, 2018).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi: (I) avaliar o intervalo e número de aplicações foliares de suspensões de bactérias biocontroladoras para o controle do CBC; (II) verificar o efeito da pulverização foliar do líquido metabólico das bactérias biocontroladoras no controle do CBC; (III) identificar a presença de genes

responsáveis pela codificação de compostos antimicrobianos nas bactérias biocontroladoras; (IV) avaliar o efeito do uso de bactérias biocontroladoras para o tratamento de sementes que transportam XFF e; (V) avaliar o efeito da pulverização de bactérias biocontroladoras em plantas de feijão em estágio de floração na sanidade das sementes produzidas.

## **2 Capítulo 1 – Controle biológico do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro por pulverizações foliares: Estudo do período de proteção, número de aplicações adicionais e da aplicação do líquido metabólico produzido pelos biocontroladores**

### **2.1 Introdução**

O crestamento bacteriano comum (CBC), incitado pelas bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP) e *X. fuscans* subsp. *fuscans* (XFF) (sin. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*), é considerado uma das doenças de maior importância para a cultura do feijão, sendo a principal dentro do grupo das bacterioses (BIANCHINI *et al.*, 2005). No Brasil não existem estimativas de perdas causadas pelo CBC, no entanto danos de 38% no Canadá e de 45% na Colômbia já foram relatados (WALLEN; JACKSON, 1975; YOSHII *et al.*, 1980).

O controle do CBC é baseado principalmente em medidas preventivas (MOURA *et al.*, 2009), visto que o controle químico tem baixa eficiência (BIANCHINI *et al.*, 2005), e o controle genético, pelo uso de cultivares resistentes é dificultado, uma vez que a maioria das cultivares em uso comercial no Brasil são suscetíveis (CTSBF, 2012).

Assim, torna-se necessário a busca por métodos de controle eficientes e com menor impacto ambiental, destacando-se o controle por microrganismos benéficos. Nos últimos anos, vários trabalhos têm relatado o controle biológico de bacterioses causadas por *Xanthomonas* spp. (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2015; NAUE *et al.*, 2014; SINGH; SIDDIQUI, 2015), inclusive trabalhos mostrando sua efetividade contra o CBC (CORRÊA *et al.*, 2017; SANGIOGO *et al.*, 2018, SILVA *et al.*, 2009; VIEIRA-JUNIOR, 2005; ZANATTA *et al.*, 2007).

O controle biológico pode ser alcançado por uma ou mais formas de atuação, incluindo antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (JAMALIZADEH *et al.*, 2011). Bactérias biocontroladoras, em especial dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, são conhecidas pela sua eficiência e diversidade em produzir antibióticos responsáveis pelo efetivo controle de várias doenças (KHABBAZ *et al.*, 2015). Estes dois gêneros também abrigam espécies indutoras de resistência sistêmica (ISR) (AKRAM *et al.*, 2014; PLANCHAMP *et al.*, 2015). A diversidade de modos de ação apresentada por essas bactérias as tornam objeto de interesse para uso preventivo (quando induzem resistência) e curativo (quando atuam por antibiose).

Além do uso por aplicação direta dos microorganismos, tem-se a possibilidade do uso do líquido metabólico produzido pelos biocontroladores no controle de patógenos. A eficácia dessa estratégia de controle tem sido relatada com frequência na literatura (KÄLVÖ; MENKIS; BROBERG, 2018; YONGGANG *et al.*, 2019). O uso do líquido metabólico no controle de doenças consiste no uso do sobrenadante de culturas líquidas dos biocontroladores, submetidas a centrifugação e filtração, com finalidade de aplicar o líquido livre dos microorganismos. O efeito do líquido metabólico pode se dar por antagonismo direto ao patógeno e/ou por indução de resistência (AKRAM; ANJUM; ALI, 2015; YONGGANG *et al.*, 2019).

A indução de resistência pode ser desencadeada sob duas formas, a resistência sistêmica induzida (ISR) e a resistência sistêmica adquirida (SAR). Ambas formas de indução de resistência produzem uma resposta fenotípica semelhante, mas apresentam rotas metabólicas distintas. ISR é desencadeada por fatores não patogênicos, como bactérias biocontroladoras ou seu líquido metabólico, já a SAR, é desencadeada por patógenos necrotizantes ou por aplicações de indutores químicos (BAKKER; PIETERSE; VAN LOON, 2003). A indução de resistência foi demonstrada em diversas espécies de plantas, ocorrendo em resposta ao tratamento com elicitores, podendo ser bióticos ou abióticos, dentre eles, os óleos essenciais (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002), os extratos vegetais (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007), produtos químicos (VIGO *et al.*, 2012), microorganismos (PIETERSE, *et al.*, 2014) e o líquido metabólico de microorganismos (AKRAM; ANJUM; ALI, 2015).

Em trabalhos anteriores, foi comprovado que os tratamentos biocontroladores DFs513, DFs769 e a combinação C03 (DFs348 + DFs769 + DFs831) foram capazes

de controlar o CBC quando aplicado via pulverização foliar pelo mecanismo de indução de resistência (SANGIOGO *et al.*, 2018), no entanto, é necessário esclarecer a existência de outros mecanismo de ação além da indução de resistência. Os modos de ação mais conhecidos são a antibiose, a competição, o parasitismo e a indução de resistência. É possível que mais de um mecanismo de ação esteja envolvido, resultando no controle da doença (BETTIOL, 1991). Portanto, o conhecimento dos mecanismos de ação pelos quais este controle se dá é essencial para a maximização deste.

Considerando o momento de intervenção no controle, temos duas formas: o controle preventivo e o controle curativo. O controle preventivo, por definição, é empregado antes da ocorrência do patógeno, por outro lado, o controle curativo, se refere a ação após a ocorrência do patógeno. Em trabalhos anteriores os isolados DFs513, DFs769 e C03 mostraram efeito tanto preventivo quanto curativo no controle do CBC, quando aplicados via pulverização foliar, mostrando seu potencial no controle do patógeno em ambas situações (SANGIOGO *et al.*, 2018).

A maioria dos trabalhos buscando o biocontrole utilizam a microbiolização de sementes como forma de dispensar as bactérias nas plantas (CORRÊA *et al.*, 2014; FIGUEREDO *et al.*, 2014; PLANCHAMP *et al.*, 2015). No entanto, pouco se tem explorado seu uso em pulverizações foliares. A aplicação do biocontrolador pela pulverização pode ser facilmente adaptada à mecanização e realizada quantas vezes forem necessárias de forma preventiva e/ou curativa, além de poder ser associada ao tratamento de sementes e outras práticas de controle.

Para a utilização de biocontroladores no campo, é necessário conhecer o período de proteção proporcionado pelo mesmo, a fim de dar a informação quanto ao intervalo necessário para novas pulverizações caso necessite, bem como determinar o efeito de pulverizações adicionais do biocontrolador, mostrando a necessidade ou não de um número maior de pulverizações. Trabalhos para seleção do intervalo e número de aplicações do agente de controle da doença alvo tem sido desenvolvidos para indutores de resistência (PONTES *et al.*, 2016), fungicidas (NASCIMENTO *et al.*, 2018) e biocontroladores (REISS; JØRGENSEN, 2017), no entanto, até então nenhum trabalho havia sido desenvolvido para testar qual melhor intervalo e número de aplicações dos biocontroladores selecionados para uso em aplicações foliares do Grupo de Pesquisa “Controle Biológico de Doenças de Plantas e Promoção de Crescimento Vegetal”.

Portanto, o objetivo deste estudo foi: (I) avaliar o intervalo e número de aplicações foliares de suspensões de bactérias biocontroladoras para o controle do CBC; (II) verificar o efeito da pulverização foliar do líquido das bactérias biocontroladoras no controle do CBC e; (III) identificar a presença de genes responsáveis pela codificação de compostos antimicrobianos nas bactérias biocontroladoras.

## 2.2 Material e métodos

Os ensaios foram realizados na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no município de Capão do Leão, entre o período de 2015 e 2019. Todos ensaios executados foram repetidos no tempo.

### 2.2.1 Microrganismos utilizados e sua manutenção

Os isolados bacterianos que foram utilizados (Tabela 1) são pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade (DFs) da UFPel. Essas bactérias, foram selecionadas para o controle do cretamento bacteriano comum do feijão quando microbiolizadas em sementes (CORRÊA, 2007; ZANATTA *et al.*, 2007) e em pulverização foliar (SANGIOGO *et al.*, 2018). A combinação de isolados biocontroladores C03 [DFs348 (*Bacillus* sp.) +DFs769 (*Bacillus cereus*) +DFs831 (*Pseudomonas fluorescens*)] foi selecionada em trabalho anterior por apresentar melhores resultados de controle quando aplicada por pulverização foliar (SANGIOGO *et al.*, 2018). O isolado DFs348 foi utilizado apenas em combinação, pois em trabalhos anteriores o mesmo não apresentou bom desempenho quando utilizado isoladamente (SANGIOGO *et al.*, 2018).

A bactéria patogênica utilizada foi *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF) isolado XFF28, anteriormente denominada *Xanthomonas axonopodis* sp. *phaseoli* var. *fuscans* (XAP28), cedido pela Embrapa Clima Temperado (Embrapa CPEAT). A virulência da bactéria foi comprovada utilizando o método de inoculação da folha por corte com tesoura, conforme descrito por Dhingra e Sinclair (1995).

Tabela 1 - Identificação e origem das bactérias utilizadas isoladamente e em combinação para o biocontrole de doenças do feijão.

Isolados	Identificação <sup>1</sup>	Local de isolamento
DFs348	<i>Bacillus cereus</i> Frankland & Frankland	Folha de cebola
DFs513	<i>Pseudomonas veronii</i> Elomari	Túnica de cebola
DFs769	<i>B. cereus</i> Frankland & Frankland	Vagem de feijão
DFs831 <sup>2</sup>	<i>P. fluorescens</i> Migula	Solo rizosférico de feijão
C03 <sup>3</sup>	DFs348+DFs769+DFs831	

<sup>1</sup> Determinados por sequenciamento do gene 16S rDNA (dados não publicados).

<sup>2</sup> Isolado utilizado apenas em combinação.

<sup>3</sup> Combinação selecionada por SANGIOGO *et al.* (2018).

Os isolados bacterianos antagonistas foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), em geladeira a 4 °C. O isolado de XFF foi também preservado em tubos de ensaio contendo meio GYCA (SWINGS; VAUTERIN; KERSTERS, 1993). A longo prazo, os isolados foram preservados em óleo, em glicerol e em solo (ROMEIRO, 2001).

## 2.2.2 Preparo das suspensões de bactérias

As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura 523 e incubadas por 24 ou 48 horas à temperatura de 28 °C. Após, foi adicionado solução salina (NaCl 0,85%) e feita a suspensão dos crescimentos bacterianos utilizando uma alça de platina, sendo preparadas as suspensões para cada um dos isolados biocontroladores e do patógeno.

A concentração das suspensões dos biocontroladores foi ajustada em espectrofotômetro para  $A_{540} = 0,4$  e para o patógeno (XFF),  $A_{540} = 0,2$ . A combinação de bactérias biocontroladoras foi composta utilizando-se volumes iguais de suspensão de cada bactéria individualmente, sendo posteriormente misturadas.

## 2.2.3 Pulverização dos tratamentos biocontroladores, inoculação do patógeno e avaliações

Para a pulverização da parte aérea, o tratamento biocontrolador testado (suspensões das bactérias biocontroladoras, ou do líquido metabólico das mesmas,

a depender do experimento em questão), foi utilizado um borrifador manual, realizando a aspersão do tratamento em planta inteira, até atingir o ponto de escoamento.

A inoculação do patógeno foi realizada imergindo uma tesoura na suspensão de inóculo de XFF28 ( $A_{540}=0,2$ ) e posteriormente executando-se dez cortes por trifólio (ROMEIRO, 2001). Após inoculação de XFF28 as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas.

Após o aparecimento dos primeiros sintomas foram feitas cinco avaliações de incidência e severidade com intervalos de dois dias cada. Para incidência foi considerado o número de cortes nas folhas que apresentarem sintomas do CBC. Para severidade foram atribuídas notas para cada corte, de acordo com escala desenvolvida por Rava (1984) (Anexo A). A partir dos dados de avaliações individuais foi calculada a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) e a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI), de acordo com a equação abaixo (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

$$\Sigma = \left( \left( \frac{n1 + n2}{2} \right) \times n^{\circ} \text{ de dias} \right) + \dots \left( \left( \frac{nx + nx}{2} \right) \times n^{\circ} \text{ de dias} \right), \text{ onde:}$$

n1: nota de severidade ou % de incidência avaliada no primeiro dia;

n2: nota de severidade ou % de incidência avaliada no segundo dia;

n° de dias: dias transcorridos entre a primeira e a segunda avaliação.

#### 2.2.4 Condução dos ensaios em vasos

Foi utilizada a cultivar de feijão preto comum BRS Valente. As plântulas de feijão foram pré-germinadas em caixas do tipo gerbox, sob papel filtro umedecido, mantidas em BOD a 25 °C por sete dias, e após foram transplantadas para os vasos (uma planta por vaso). As plantas foram conduzidas em vasos com capacidade para 2 kg, em uma mistura de 2 partes de solo e 1 parte de substrato comercial não esterilizado, mantidas em casa de vegetação, com irrigação diária diretamente no colo da planta, sem aspergir as folhas. Os vasos, acondicionados em bancadas elevadas do solo, foram rotacionados aleatoriamente, semanalmente, para garantir a aleatoriedade dos efeitos ambientais não controláveis. Para os ensaios que foram realizados em casa de vegetação, a metodologia de condução das plantas até o início das aplicações foi a mesma.



### 2.2.5 Ensaio I: Determinação do período de proteção proporcionado pelos tratamentos biocontroladores

Nesse ensaio foram utilizados os isolados biocontroladores, DFs513, DFs769 e combinação 3 (C03), e como testemunha foi utilizado apenas água estéril. As aplicações iniciaram quando as plantas atingiram o terceiro trifólio expandido. Para determinar o período de proteção proporcionado pelos tratamentos biocontroladores, foi determinado o período de tempo em que cada tratamento se mantém efetivo no controle ao CBC. Para isso, foram testados diferentes intervalos de tempo entre a aplicação do biocontrolador e a posterior inoculação do patógeno, sendo eles: dois, quatro, seis, oito e dez dias (Figura 1).

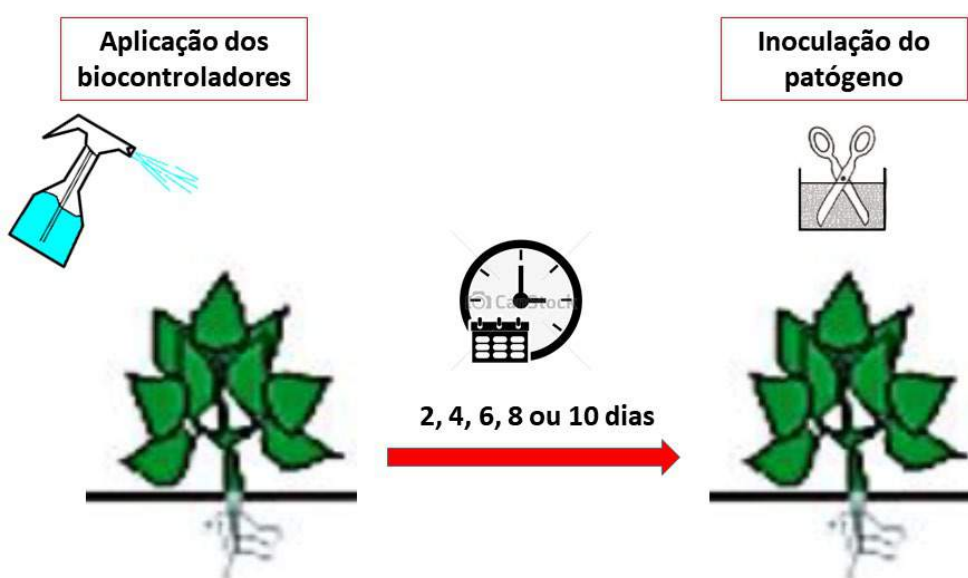


Figura 1 – Esquema ilustrativo de experimento para determinação do período de proteção proporcionado pelos tratamentos biocontroladores.

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 5 (Biocontroladores x intervalos entre aplicações), com seis repetições cada, em que cada vaso constitui uma unidade experimental.

### 2.2.6 Ensaio II: Efeito cumulativo de pulverizações adicionais de biocontroladores no controle do CBC

Para determinar o efeito de pulverizações adicionais no controle do CBC, os tratamentos bacterianos foram testados em múltiplas pulverizações foliares,

utilizando o intervalo de tempo de sete dias. Foram avaliados três números de aplicações (1, 2, 3). No tratamento em que foram realizadas três aplicações (3X), a primeira aplicação foi feita quando as plantas atingiram o segundo trifólio expandido, a segunda aplicação feita sete dias após, e a terceira aplicação sete dias após a segunda; no tratamento em que foram realizadas duas aplicações (2X), a primeira aplicação coincidiu com a segunda aplicação do tratamento 3X, sendo a segunda aplicação realizada sete dias após; no tratamento em que foi realizada uma única aplicação, a mesma coincidiu com a última aplicação dos demais tratamentos. Sete dias após a última aplicação, foi realizada a inoculação do patógeno (Figura 2). Após o aparecimento dos primeiros sintomas, as avaliações foram realizadas conforme metodologia relatada no item 2.2.3.

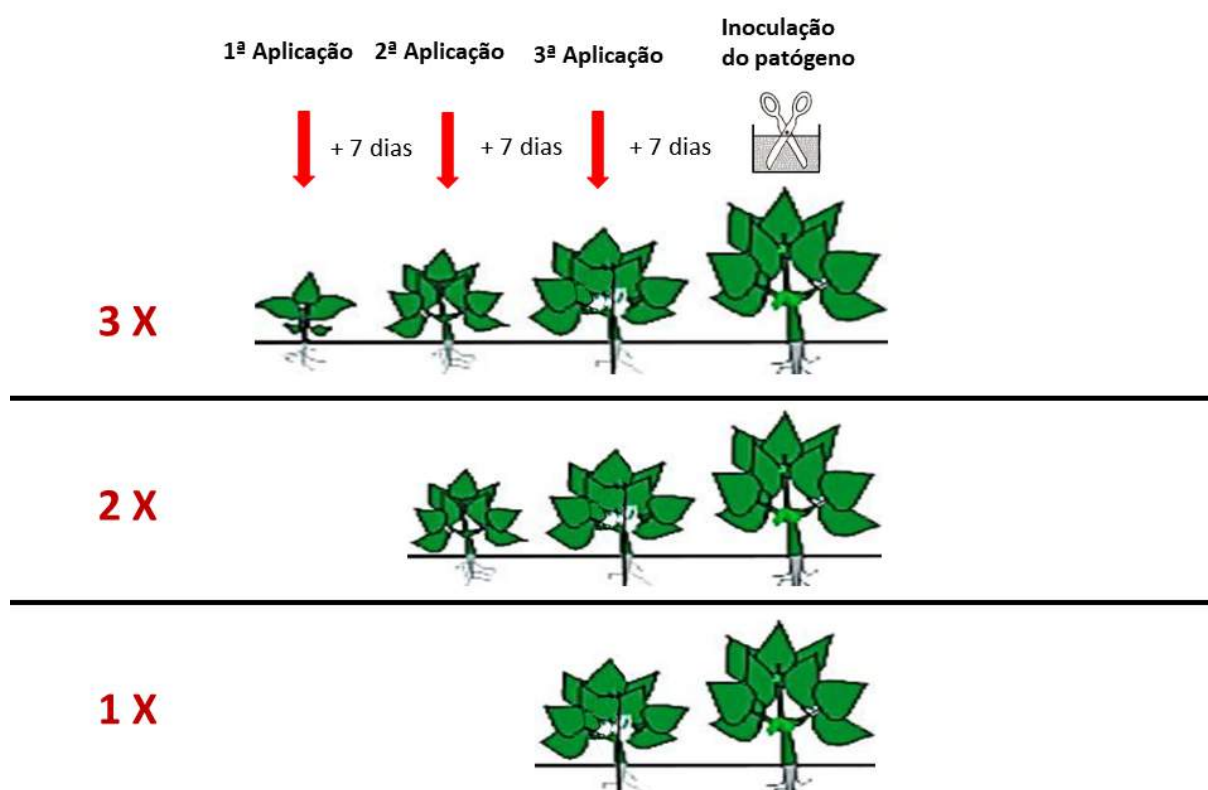


Figura 2 – Esquema ilustrativo de experimento para avaliar o efeito cumulativo de pulverizações adicionais de biocontroladores no controle do Crestamento Bacteriano Comum do feijoeiro.

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3 (tratamentos bacterianos x número de pulverizações), com quatro repetições, em que cada vaso constitui uma unidade experimental.

## **2.2.7 Ensaio III: Efeito da pulverização do líquido metabólico de bactérias biocontroladoras no controle do CBC e detecção de genes relacionados à produção de compostos antimicrobianos**

### **2.2.7.1 Antibiose *in vitro* do líquido metabólico dos isolados biocontroladores**

O líquido metabólico dos isolados biocontroladores foi utilizado em teste de antibiose contra XFF28, a fim de verificar se o líquido metabólico dos isolados teria atividade antagonista ao patógeno.

Para obtenção do líquido metabólico dos tratamentos biocontroladores, os isolados bacterianos DFs513, DFs769, DFs348 e DFs831 foram crescidos em meio 523 líquido, por 24 horas, a 28 °C. Em seguida, o crescimento bacteriano foi centrifugado e filtrado a vácuo, através de uma membrana millipore de 0,22 micra.

Em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, estéreis, foram vertidos 10 mL de ágar-água 2%, sobre esta camada foram adicionados 10 mL de meio 523 semi-sólido (1,0% de ágar) fundente e resfriado a  $\pm$  48 °C, aos quais a XFF28 foi incorporada. A incorporação da bactéria foi feita pela adição de 100  $\mu$ L (a cada 10 mL de meio semi-sólido) de crescimento bacteriano em meio 523 líquido com 24 horas de crescimento a 28 °C. Após a solidificação do meio, foram depositados discos de papel do tipo “mata borrão” nas placas esterilizadas, uniformemente distanciados (4 por placa). Sobre os discos de papel, foram pipetados 10  $\mu$ L do líquido metabólico de cada isolado separadamente. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 horas e, após este tempo, foram avaliados a ocorrência ou não de halos de inibição do crescimento do patógeno.

### **2.2.7.2 Efeito da pulverização do líquido metabólico de bactérias biocontroladoras no controle do CBC**

A fim de testar o efeito da pulverização foliar do líquido metabólico de bactérias biocontroladoras no controle do CBC dos isolados DFs513, DFs769 e isolados que compõe a combinação C03. O crescimento bacteriano foi centrifugado, o pelet formado foi lavado e centrifugado novamente, após o pelet foi ressuspensionado, consistindo no tratamento “Isolado Vivo”; a mesma suspensão foi adicionado quitina insolúvel (0,1g L<sup>-1</sup>), consistindo no tratamento “Isolado Vivo + Quitina”; a suspensão foi submetida a fervura em autoclave, consistindo no tratamento “Isolado

Morto”; e por fim o sobrenadante do meio líquido com crescimento bacteriano foi submetido a filtração a vácuo, através de uma membrana millipore de 0,22 micra, representando o tratamento “Meio líquido” (Figura 3).

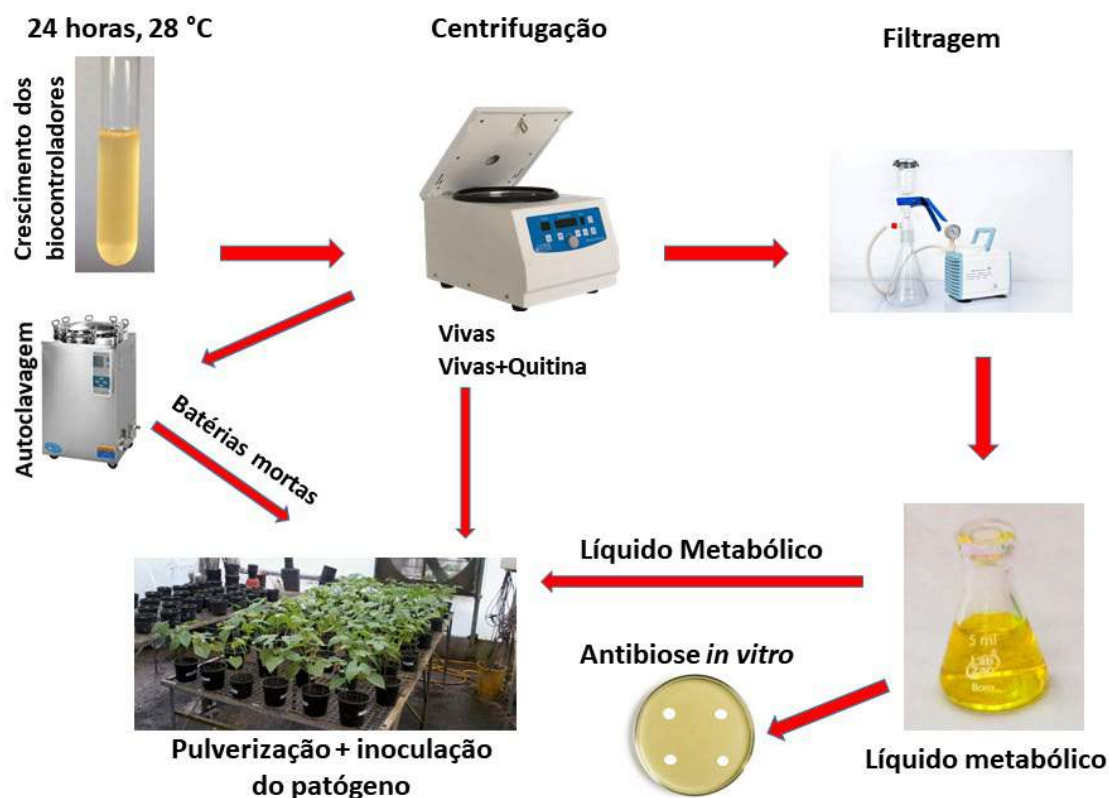


Figura 3 – Esquema ilustrativo de experimento estudando o efeito da pulverização do líquido metabólico de bactérias biocontroladoras no controle do crescimento bacteriano comum do feijoeiro.

Após o aparecimento dos primeiros sintomas, as avaliações foram realizadas conforme metodologia relatada no item 2.2.3.

Para fins de análise e delineamento experimental, cada isolado biocontrolador correspondeu a um experimento independente dos demais, em delineamento inteiramente casualizado, com seis repetições.

### 2.2.7.2 Detecção molecular de genes responsáveis pela codificação de compostos antimicrobianos

Para extração do DNA dos isolados bacterianos (Tabela 1), estes foram repicados em placas de Petri contendo meio 523 e incubados durante 48 horas em

BOD a 28°C. Foram realizadas suspenções desses isolados em água mili-Q, transferindo-se 2 mL da suspensão para tubos de reação os quais foram centrifugados a 1800 g. O pellet formado foi ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl pH 8,0, 10 mM, EDTA 1 mM), adicionados mais 100 µL de tampão de lise (NaOH 0,1 N e SDS 1%). Os tubos foram agitados por cinco suaves inversões, e após, centrifugados a 12000 g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de reação (1,5 mL), adicionado 1 mL de etanol (95%) em cada, centrifugados a 12000 g por 15 min. O sobrenadante foi descartado, e adicionado 1 mL de etanol (70%), sendo o tubo agitado por 5 suaves inversões e centrifugado a 12000 g por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e o tubo foi deixado secando a temperatura ambiente até secagem de umidade aparente no interior dos tubos, por fim, o DNA precipitado nos tubos foi solubilizado em 100 µL de tampão TE (DE BOER; WARD, 1995).

Para a detecção de genes responsáveis pela produção de compostos antimicrobianos em isolados do gênero *Bacillus* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: ITUD [5'-TTG-AAY-GTC-AGY-GCS-CCT-TT-3' e 5'-TGC-GMA-AAT-AAT-GGS-GTC-GT-3'] para detectar simultaneamente os genes *bamD*, *ituD* e *fenF*, pertencentes à região genômica conservada, que codifica malonil-CoAtransacilase, envolvida na biossíntese de bacillomicina-D, iturina e micosubilitina, respectivamente; BACAB [5'-CTT-CTC-CAA-GGG-GTG-AAC-AG-3' e 5'-TGT-AGG-TTT-CAC-CGG-CTT-TC-3'], MRSA [5'-GGG-TAT-ATG-CGG-TAT-AAA-CTT-ATG-3' e 5'-GTT-TCC-CCA-ATG-ATT-TAC-CCT-C-3'] e SFP [5'-ATG-AAG-ATT-TAC-GGA-ATT-TA-3' e 5'-TTA-TAA-AAG-CTC-TTC-GTA-CG-3'] para amplificar as regiões genômicas específicas, identificadas como genes *bacAB*, *mrsA* e *sfP*, que codificam bacilisina, mersacidina e surfactina, respectivamente (CHUNG et al., 2008).

Já para os isolados do gênero *Pseudomonas* foram utilizados os seguintes iniciadores: PCA [5'-TGCCAAGCCTCGCT CCAAC-3' e 5'-CGCGTTGTTCTCGTTCAT-3], DAPG [5'-GAGGACGTCGAAGACCACCA-3' e 5'-ACC GCAGCATCGTGTATGAG-3'], PRN [5'-CCACAA GCCCGGCCAGGAGC-3' e 5'-GAGAAGAGCGGGTCGATGAAGCC-3'], PLT [5'-CGGAGCATGGACCCCCAGC-3' e 5'-GTGCCCGATATTGGTCTTGACCG-AG-3'] e HCN [5'-ACTGCCAG GGGCGGATGTGC-3' e 5'-ACGATGTGCTCGGCGTAC-3'], que codificam para a produção dos compostos: 2,4-diacetylphloroglucionol, fenazina-1-carboxílico,

pirrolnitrina, pioluteorina e cianeto de hidrogênio, respectivamente (NAIK et al., 2008).

A reação da cadeia da polimerase (PCR) teve um volume total de 13  $\mu\text{L}$ , onde 6,5  $\mu\text{L}$  de GoTaq (Kit Promega®); 2  $\mu\text{L}$  do primer R e F; 1  $\mu\text{L}$  de DNA ( $100\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ ) e 3,5  $\mu\text{L}$  de água miliQ. A amplificação foi realizada em termociclador, utilizando temperatura de anelamento de acordo com cada primer. O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 1X a 7 V  $\text{cm}^{-1}$ . Como marcador de massa molecular foi utilizado o marcador 1KB Ludwig®. Para a visualização do amplicon, foi utilizado o corante Blue Green e o resultado foi registrado em fotodocumentador.

### 2.2.8 Análises estatísticas dos dados

Para os experimentos 1 e 3, foi realizada análise de componentes principais (ACP) com as variáveis Incidência Inicial, AACPI, Severidade Final e AACPS, a fim de observar o comportamento geral dos tratamentos considerando todas variáveis avaliadas.

Os dados foram analisados quanto à presença de *outliers* (valores discrepantes) e quanto aos pressupostos da análise de variação (normalidade dos resíduos e homocedasticidade dos resíduos). A detecção da presença de outliers foi feita por meio da análise de gráficos de resíduos e gráficos Box-Plot. A análise da normalidade e homocedasticidade foram feitas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Atendidos os pressupostos, foi realizada análise de variância e comparações de médias.

Todos experimentos foram repetidos no tempo uma vez, para análise, havendo homogeneidade entre as variâncias residuais dos experimentos (ambas réplicas), foi realizada análise de variância conjunta dos mesmos. Foi considerado como variâncias residuais homogêneas quando as relações dos quadrados médios residuais das análises de variância individuais de cada réplica não ultrapassaram a relação 7:1 (BANZATTO; KRONKA, 2006).

Quando se tratou de experimentos fatoriais (Ensaio I e II) e a interação entre os fatores foi significativa foi feito o desdobramento da interação, realizando comparações múltiplas de médias pelo teste de Duncan, comparando cada nível do fator A dentro de cada nível do outro fator B, e vice-versa.

O nível de significância considerado foi de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no software R 3.5.1 (2018), utilizando os pacotes agricolae (MENDIBURU, 2017), openxlsx 4.1.0 (WALKER, 2018), FactoMineR 1.4.1 (LE; JOSSE; HUSSON, 2008), factoextra 1.0.5 (KASSAMBARA; MUNDT, 2017) e corrplot (WEI; SIMKO, 2017).

### **2.3 Resultados e Discussão**

Para viabilizar a utilização dos tratamentos biocontroladores selecionados no controle de doenças de plantas no campo, não basta apenas dispor das informações quanto a efetividade destes frente ao patógeno, é necessário uma série de informações adicionais, que servirão de base para orientações técnicas quanto à utilização do produto. Uma dessas informações é o período de proteção proporcionado pelo biocontrolador após sua aplicação, essa informação é essencial para determinar o período em que as plantas estarão protegidas e até mesmo para estabelecer o intervalo necessário entre novas pulverizações quando necessário. Nesse sentido, para estudar o efeito dos tratamentos utilizados, no comportamento de todas as variáveis avaliadas no experimento em uma maneira conjunta, foi dada uma abordagem na análise multivariada dos dados. Para isso, foi realizada a análise dos componentes principais, que resultou em um primeiro componente principal (Dim1) que explica 74,3% da variação total dos dados, e um segundo componente principal (Dim2) que explica 17,9%, acumulando um total de 92,2% nos dois primeiros componentes principais (Figura 4A).

A porcentagem da variância acumulada é um critério empírico indicado para escolha do número de componentes principais que irão representar a variação dos dados, e recomenda-se que sejam utilizados os componentes que consigam acumular uma explicação de, pelo menos, 70% da variabilidade total dos dados (KAISER, 1960 apud MARDIA; KENT; BIBBY, 1979). Nesse sentido, os dois primeiros componentes foram escolhidos. Sendo assim, tem-se que o primeiro componente principal já é altamente explicativo para o modelo. A figura 4 B mostra a qualidade de representação de cada variável resposta em cada respectivo componente principal, representado pelo tamanho do círculo, e a correlação dessa variável resposta com cada componente principal, representado pela coloração do círculo. Dessa forma, o primeiro componente principal está altamente

correlacionado, bem como é melhor representado, pelas variáveis Incidência inicial (II), AACPI e AACPS, já o componente 2 é melhor representado e mais correlacionado a Severidade Final (SF).

O componente principal 1 (Dim1) está positivamente relacionado a todas variáveis de doença avaliadas nesse experimento, nota-se que os tratamentos com intervalos entre aplicações de 8 e 10 dias, com exceção do DFs769, encontram-se à direita do eixo do Dim1, ou seja, esses tratamentos estão relacionados aos maiores valores de II, AACPI, SF e AACPS. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos nas análises das variáveis separadamente (Figuras 5 e 6), ou seja, no geral, os melhores resultados de controle foram encontrados para intervalos entre aplicações de biocontroladores e patógenos inferiores a 8 dias.

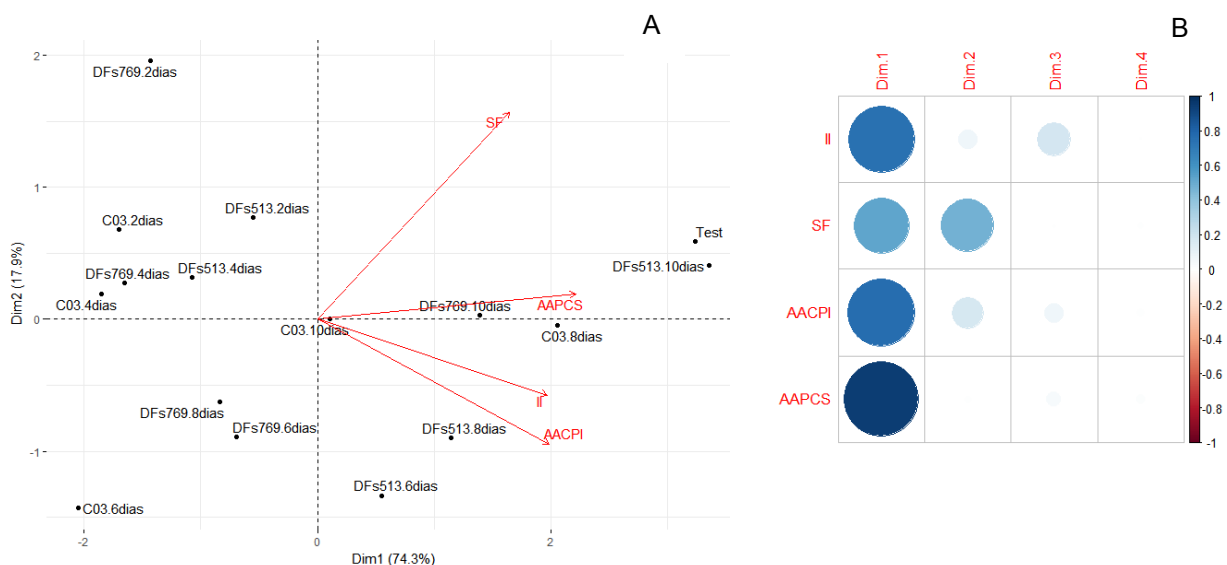


Figura 4 – Representação da análise de componentes principais (A) e matriz de correlações (escala de cores) e contribuição (tamanho de círculo) de cada variável em relação aos componentes principais (B), de resultados de experimento avaliando a Incidência Inicial (II), Área Abaixo da Curva de Progresso da Incidência (AACPI), Severidade Final (SF) e Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS), em plantas de feijão pulverizadas com diferentes tratamentos com biocontroladores, em diferentes intervalos entre aplicação dos biocontroladores e inoculação do patógeno. O patógeno, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, foi inoculado pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação. Test (água estéril); DFs513 (*Pseudomonas veronii*); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03[DFs348 (*Bacillus cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)].

Visto que as variáveis resposta estão correlacionadas (Figura 4A), a apresentação das análises univariadas de todas traria uma redundância de informações, portanto foram selecionadas as variáveis II e AACPS para realização das análises de variância e de comparações de médias.



Na análise de variância (ANOVA), não foi verificada uma interação significativa entre efeitos de tratamentos com os isolados biocontroladores e intervalos entre aplicações para incidência inicial (valor-p: 0,99) e AACPS (valor-p: 0,71), sendo realizada então a análise dos efeitos simples de tratamentos, no entanto, optou-se por realizar análise dos efeitos de intervalo entre aplicações por tratamentobiocontrolador, a fim de melhor compreender a dinâmica da resposta para cada isolado individualmente, visto se tratar do objetivo principal desse ensaio (Figura 5).

Embora os tratamentos DFs769 e C03 tenham apresentado incidências iniciais ligeiramente inferiores à testemunha, o que indica uma tendência de atraso da epidemia, nenhum dos tratamentos diferiu significativamente quanto a essa variável (Figura 5A).

Quando avaliado o intervalo entre as aplicações, para o isolado DFs513, nota-se que a menor incidência inicial foi observada no intervalo de 4 dias entre aplicação do biocontrolador e patógeno, no entanto, a média de incidência inicial para esse intervalo não diferiu significativamente dos intervalos 2, 6 e 8 dias (Figura 5B). Para os tratamentos com DFs769 e C03, todos intervalos entre aplicações foram estatisticamente iguais entre si (Figuras 5C e 5D, respectivamente).

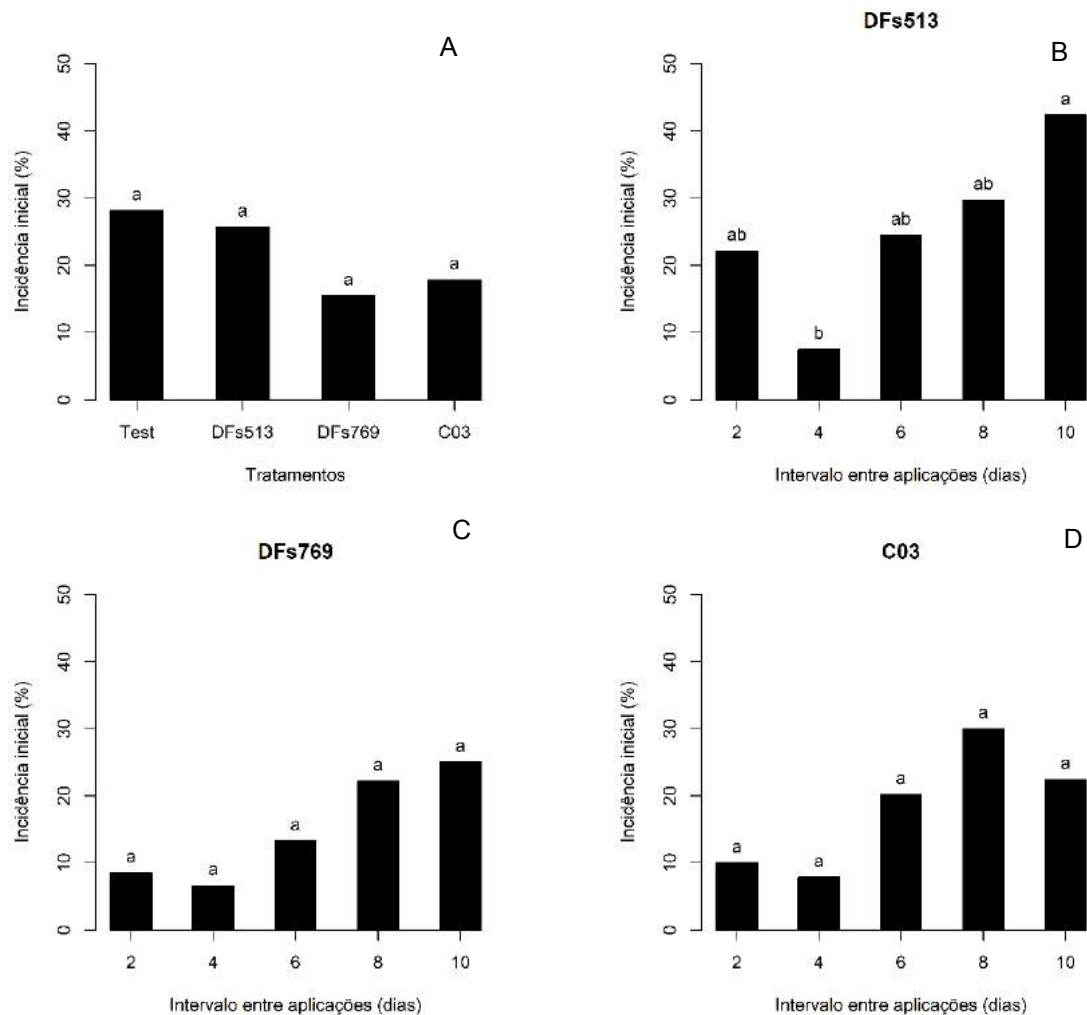


Figura 5 - Média da incidência inicial de Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro, em plantas de feijão pulverizadas com diferentes tratamentos com biocontroladores (A), em diferentes intervalos entre aplicação dos biocontroladores e inoculação do patógeno (B, C e D). O patógeno, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, foi inoculado pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação. Test (água estéril); DFs513 (*Pseudomonas veronii*); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03 [DFs348 (*Bacillus cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)]. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Quando se analisa a Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade do CBC, nota-se que todos tratamentos diferiram da testemunha (água) (Figura 6A). Os tratamentos DFs513, DFs769 e C03 proporcionaram uma redução de 25,4%, 32,2% e 34,5% da AACPS em relação a testemunha, respectivamente. O tratamento com DFs513 apresentou os menores valores de AACPS quando utilizado intervalo de 2 e 4 dias, mas esse intervalo não diferiu significativamente dos intervalos de 6 e 8 dias (Figura 6B). Para o tratamento com DFs769, embora o menor valor de AACPS tenha sido para 2 dias de intervalo, o mesmo não diferiu significativamente dos intervalos de 4, 6 e 8 dias (Figura 6C). Na C03, os intervalos com menores valores de AACPS foram os de 2, 4 e 6 dias (Figura 6D).

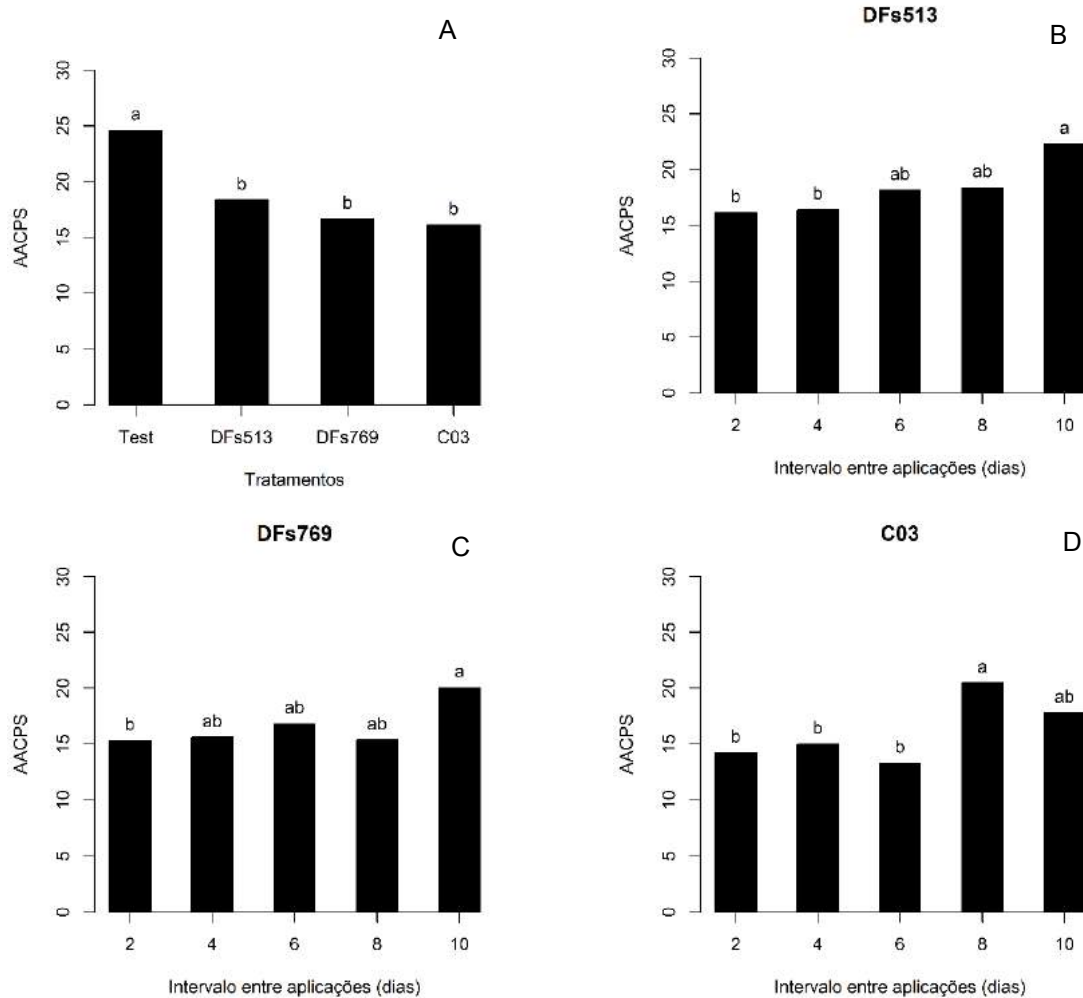


Figura 6 - Média da Média da Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro, em plantas de feijão pulverizadas com diferentes tratamentos com biocontroladores (A), em diferentes intervalos entre aplicação dos biocontroladores e inoculação do patógeno (B, C e D). O patógeno, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, foi inoculado pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação. Test (água estéril); DFs513 (*Pseudomonas veronii*); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03[DFs348 (*Bacillus cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)]. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Após estabelecido o período de proteção proporcionado pela pulverização foliar dos tratamentos biocontroladores, foi realizado o estudo do efeito de pulverizações adicionais no controle do CBC. Nesse experimento, buscou-se identificar a ocorrência de algum efeito aditivo no biocontrole quando realizadas aplicações adicionais dos biocontroladores. Verificou-se que não ocorreu interação significativa entre o número de aplicações e tratamentos com isolados biocontroladores, tanto para incidência inicial (valor-p: 0,43) como para a AACPS (valor-p: 0,12), ou seja, não foi identificada uma resposta diferencial entre os tratamentos biocontroladores quanto ao número de aplicações. Portanto, foi feita

análise dos efeitos simples, realizando comparações de médias para tratamentos e para número de pulverizações.

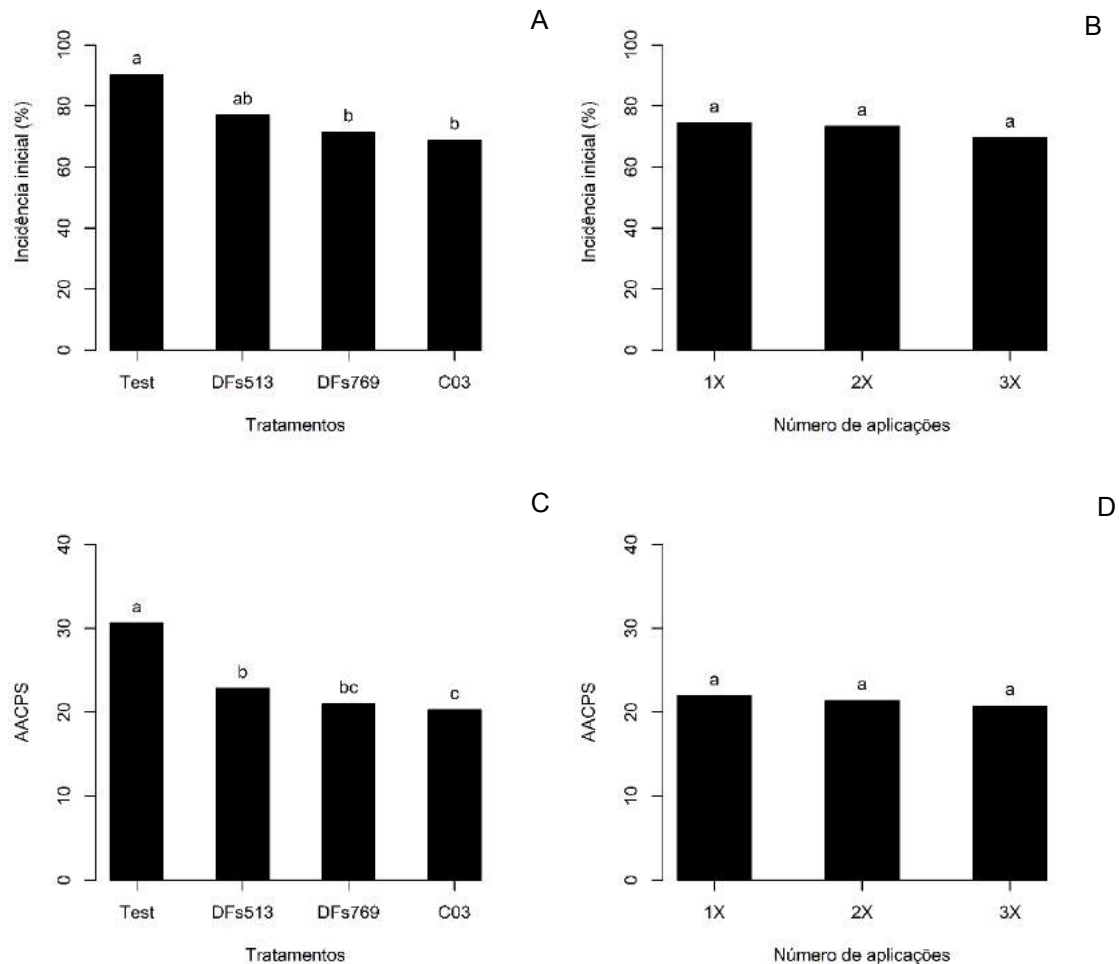


Figura 7 - Médias da incidência inicial (A, B) e Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) (C, D) do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro, em plantas de feijão pulverizadas uma (1X), duas (2X) ou três (3X) com diferentes tratamentos com biocontroladores. O patógeno, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, foi inoculado pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação. Test (água estéril); DFs513 (*Pseudomonas veronii*); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03[DFs348 (*Bacillus cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)]. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Em análise da incidência inicial (valor-p: 0,049), nota-se que os tratamentos que proporcionaram as menores médias de incidência foram aqueles com os isolados biocontroladores DFs769 e C03, diferindo significativamente da testemunha e proporcionando uma redução de 20,9% e 23,8% dessa variável em relação a testemunha, respectivamente. O isolado DFs513 não diferiu da testemunha (Figura 7A).

Já em relação ao número de aplicações, não foi identificada diferença significativa entre os tratamentos (valor-p: 0,84), sendo assim, entende-se que o número de aplicações, dentro do intervalo de tempo testado, não interferiu no período de incubação do patógeno (Figura 7B).

Em análise da AACPS (valor-p: <0,001), observa-se comportamento semelhante à incidência inicial, aqui, os tratamentos que proporcionaram os menores valores da AACPS seguiram sendo DFs769 e C03, no entanto, para essa variável, o tratamento com DFs513 também diferiu significativamente da testemunha. Para essa variável, os tratamentos DFs513, DFs769 e C03 proporcionaram uma redução de 25,3%, 28,6% e 33,7% em relação a testemunha, respectivamente. Quanto ao número de aplicações, bem como para incidência inicial, não se observou diferença significativa entre os tratamentos (valor-p: 0,35), portanto, pode se afirmar que pulverizações adicionais, com um intervalo de 7 dias entre aplicações, não incrementaram o controle proporcionado pelos biocontroladores.

Alternativamente a aplicação direta dos biocontroladores, tem-se a possibilidade do uso do líquido metabólico produzido pelos mesmos, que podem conter antibióticos e outras substâncias antimicrobianas e/ou indutoras de resistência. Para determinar se o uso do líquido metabólico dos isolados biocontroladores usados no presente trabalho possuem efeito no controle do CBC, foi realizado o experimento III, onde foram testados diferentes variações dos tratamentos com os agentes biocontroladores. Como controle positivo, foi utilizada quitina insolúvel, indutora de resistência (MOTA; SANTOS, 2016; BEN-SHALOM *et al.*, 2002). Estudou-se o efeito do uso da suspensão do biocontrolador vivo (V), biocontrolador morto por fervura em autoclave (M), biocontrolador vivo + quitina (Q) e líquido metabólico do biocontrolador (LM). Para auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação envolvidos, foi avaliado o efeito antimicrobiano do líquido metabólico dos tratamentos biocontroladores, não sendo possível observar nenhum efeito antimicrobiano sobre o isolado XFF28. Sendo assim, entende-se que o LM dos biocontroladores desse estudo não atua por antibiose no controle do CBC.

A análise de componentes principais desse experimento resultou em um primeiro componente principal (Dim1) que explica 63,5% da variação total dos dados, um segundo componente principal (Dim2) que explica 26,1% da variação total dos dados, acumulando um total de 89,6% da variância dos dados explicada

nos dois primeiros componentes principais (Figura 8A), portanto, os dois primeiros componentes foram suficientes para explicar a variação dos dados. O primeiro componente principal está altamente correlacionado, bem como é melhor representado, pelas variáveis Incidência inicial (II), AACPI e AACPS, e o componente 2 pela Severidade Final (SF) (Figura 8B).

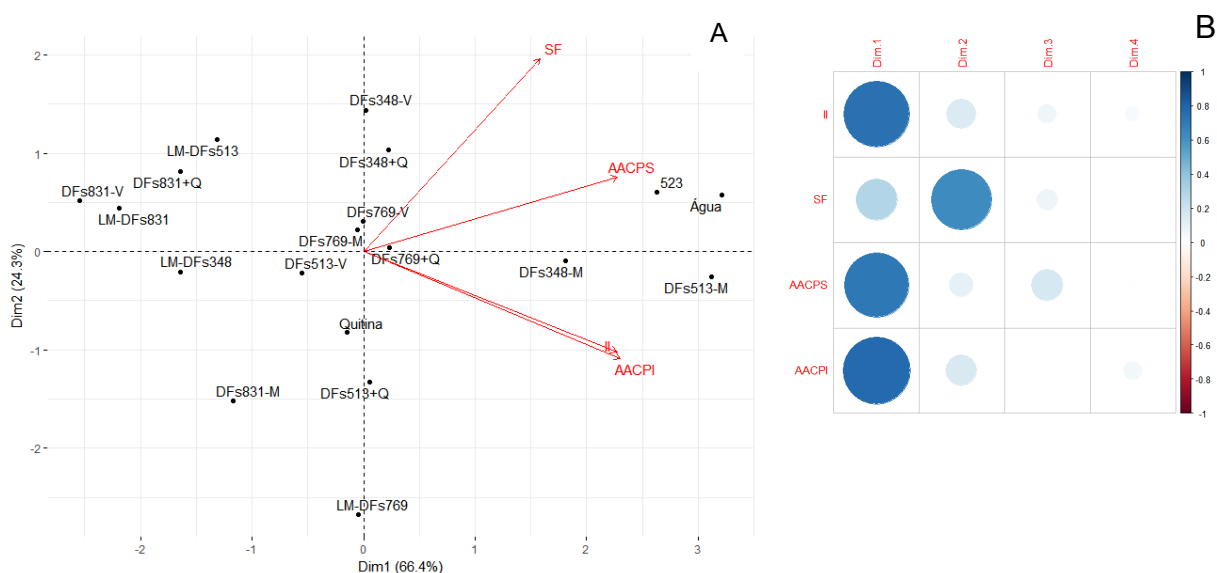


Figura 8 – Representação da análise de componentes principais (A) e matriz de correlações (escala de cores) e contribuição (tamanho de círculo) de cada variável em relação aos componentes principais (B), de resultados de experimento avaliando a Incidência Inicial (II), Área Abaixo da Curva de Progresso da Incidência (AACPI), Severidade Final (SF) e Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS), em plantas de feijão pulverizadas com diferentes variações de tratamentos com bactérias biocontroladoras, sendo utilizado o isolado biocontrolador vivo (V), morto (M), vivo + quitina (+Q) e líquido metabólico do biocontrolador (LM). O patógeno, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, foi inoculado pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação. Água (água estéril); DFs513 (*Pseudomonas veronii*); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03[DFs348 (*Bacillus cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)].

O componente principal 1 (Dim1) está positivamente relacionado a todas as variáveis de doença avaliadas nesse experimento. Nota-se que os tratamentos DFs348-M, DFs513-M, bem como a testemunha negativa (água), encontram-se mais à direita do eixo Dim1, ou seja, esses tratamentos estão relacionados aos maiores valores de II, AACPI, SF e AACPS. Esses resultados corroboram com os resultados obtidos nas análises das variáveis separadamente (Figura 9), mostrando que o líquido metabólico produzido pelos biocontroladores testados possui efeito similar ao uso do biocontrolador vivo, podendo ser utilizado para pulverizações foliares visando o controle do CBC.

O controle negativo “meio líquido”, não foi representado nos resultados, por ter apresentado mesmo efeito do controle negativo “água”.

Para o isolado DFs348, o único tratamento que não proporcionou redução significativa na incidência inicial (Figura 9A) e da AACPS (Figura 9B), foi o uso do isolado morto (DFs348-M). Os tratamentos com biocontrolador vivo (DFs348-V), vivo+quitina (DFs348+Q) e líquido metabólico do biocontrolador (LM-DFs348) proporcionaram os menores valores de incidência inicial e AACPS, com reduções de 30,6%, 33% e 49,2%, para incidência inicial e de 20,8%, 34,9% e 31,4% para AACPS, respectivamente.

O isolado DFs513 morto não foi capaz de reduzir significativamente a incidência inicial, por outro lado, DFs513 vivo, o uso combinado do isolado vivo com quitina bem como o LM do biocontrolador resultaram em redução significativa dessa variável (Figura 9C). Já para a AACPS, todas variações desse biocontrolador, apresentaram efeito significativo na redução da variável, não diferindo nem mesmo do controle positivo (Figura 9D). Os tratamentos DFs513-V, DFs513+Q e LM-DFs513 proporcionaram uma redução da incidência inicial de 13,2%, 44,1% e 39%, respectivamente. Já para a AACPS, os tratamentos DFs513-M, DFs513-V, DFs513+Q e LM-DFs513, proporcionaram uma redução de 28,8%, 28,3%, 36,7% e 30,1%, respectivamente.

O isolado DFs769, reduziu significativamente a incidência inicial do CBC quando utilizado morto e vivo, com uma redução dessa variável em relação a testemunha de 37,2% e 29%, respectivamente (Figura 9E). Para a variável AACPS, todas variações de uso desse biocontrolador reduziram significativamente essa variável, proporcionando uma redução de 42,5%, 42%, 39,4% e 37,6%, para os tratamentos DFs769-M, DFs769-V, DFs769+Q e LM-DFs769, respectivamente (Figura 9F).

O isolado DFs831 reduziu significativamente a incidência inicial e AACPS em todas suas variações testadas, apresentando ainda um efeito aditivo quando utilizado vivo mais quitina (Figuras 9G e 9H). Os tratamentos DFs831-M, DFs831-V, DFs831+Q e LM-DFs831 reduziram em 41,2%, 43,5%, 64,1% e 32,4% a incidência inicial e em 38,5%, 39,8%, 59,7% e 43,4% para a AACPS, respectivamente.

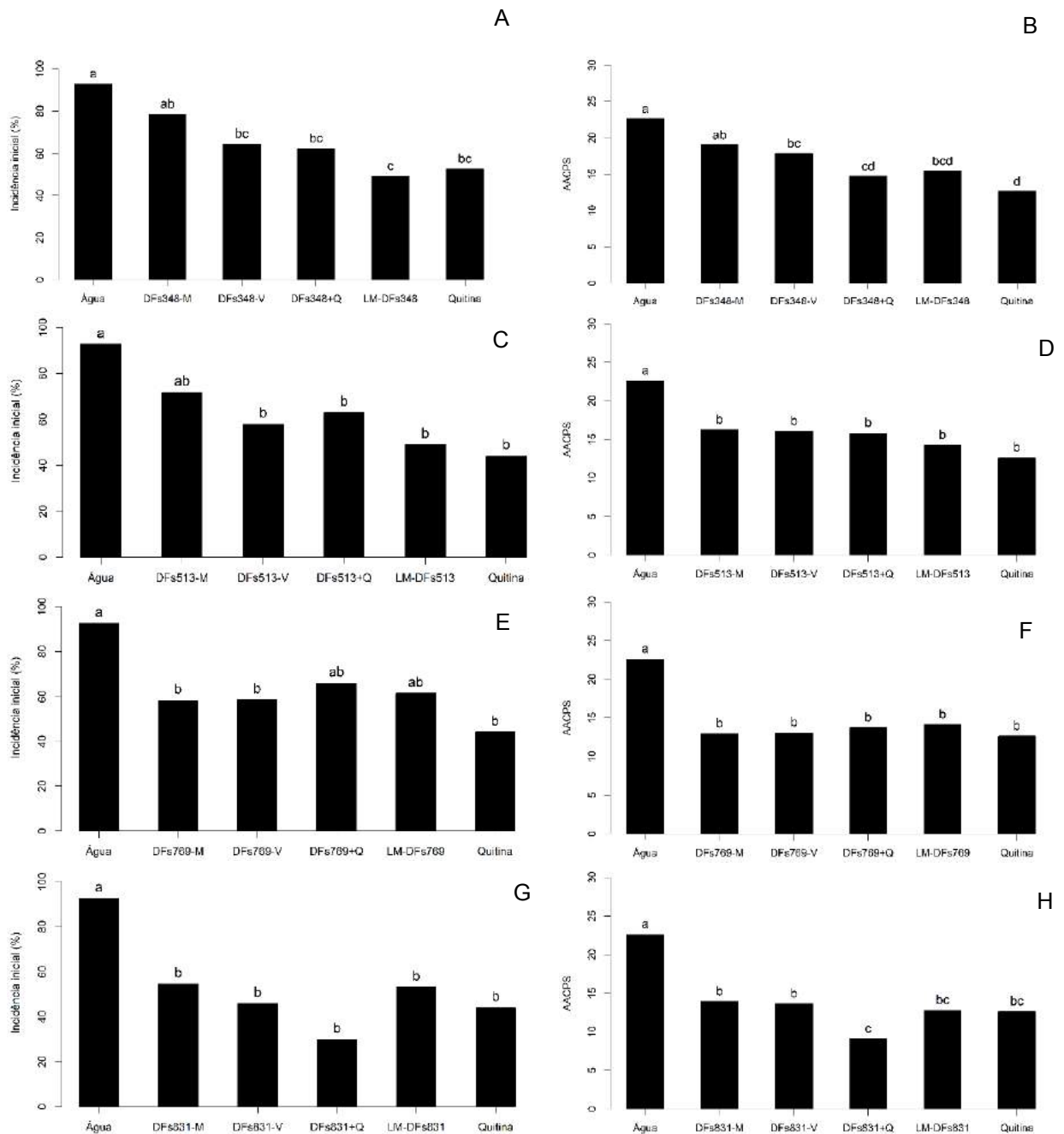


Figura 9 - Médias da incidência inicial e Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro, em plantas de feijão pulverizadas com diferentes variações de tratamentos com bactérias biocontroladoras, sendo utilizado o isolado biocontrolador vivo (V), morto (M), vivo + quitina (+Q) e líquido metabólico do biocontrolador (LM). O patógeno, *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*, foi inoculado pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação. Água (água estéril); DFs348 (*Bacillus cereus*) (A e B); DFs513 (*Pseudomonas veronii*) (C e D); DFs769 (*B. cereus*) (E e F); DFs831 (*P. fluorescens*) (G e H); Quitina (quitina insolúvel). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

De uma maneira geral, com exceção do isolado DFs348 quando utilizado morto, todos os demais apresentaram uma redução significativa da AACPS em relação à testemunha negativa (água), não diferindo da testemunha positiva a indução de resistência (quitina), levando-se em conta o fato do líquido metabólico desses isolados não ter provocado efeito significativo na inibição do patógeno,



entende-se que esses isolados atuaram induzindo a resistência ao CBC nas plantas de feijão, havendo ainda a possibilidade de haver mais de um mecanismo de biocontrole associado ao tratamento com o isolado DFs831. Sangiogo e colaboradores (2018), em trabalho anterior avaliando os isolados testados no presente estudo, chegaram à conclusão de que os isolados DFs513, DFs769 e C03, controlaram o CBC mesmo havendo uma separação espacial entre a aplicação dos biocontroladores e do patógeno (aplicação em trifólios distintos), além disso, os isolados DFs769 e DFs831 induziram a produção de faseolina, reforçando a tese de que esses tratamentos atuam como indutores de resistência ao CBC.

Como pode ser visto na Tabela 2, para os isolados do gênero *Bacillus*, foi detectada a presença dos genes *bacAB* e *bamD/ituD/fenF* responsáveis pela produção de Bacilisina, Bacillomicina-D, Iturina e Micosubilitina no isolado DFs348, e Bacilisina, Iturina e Surfactina no isolado DFs769. Para os isolados do gênero *Pseudomonas* (DFs513 e DFs831), foram detectados genes relacionados à produção dos antibióticos 2,4-diacetylphloroglucinol, Ácido fenazina-1-carboxílico (C,D), Pirrolnitrina e Cianeto de hidrogênio para o isolado DFs831, e para o isolado DFs513 o gene relacionado ao antibiótico 2,4-diacetylphloroglucinol.

Tabela 2 – Genes identificados por marcadores moleculares específicos em isolados de bactérias biocontroladoras.

Isolados	Genes detectados
DFs348	<i>bacAB</i> <sup>1</sup> ; <i>bamD</i> <sup>2</sup> / <i>ituD</i> <sup>3</sup> / <i>fenF</i> <sup>4</sup>
DFs769	<i>bacAB</i> ; <i>bamD/ituD/fenF</i> ; <i>sfP</i> <sup>5</sup>
DFs513	<i>phI</i> <sup>6</sup>
DFs831	<i>phI</i> ; <i>phzCD</i> <sup>7</sup> ; <i>prnc</i> <sup>8</sup> ; <i>hcnBC</i> <sup>9</sup>

<sup>1</sup>Bacilisina. <sup>2</sup> Bacillomicina-D. <sup>3</sup> Iturina. <sup>4</sup>Micosubilitina. <sup>5</sup>Surfactina. <sup>6</sup>2,4-diacetylphloroglucinol. <sup>7</sup>Ácido fenazina-1-carboxílico (C,D).<sup>8</sup>Pirrolnitrina. <sup>9</sup>Cianeto de hidrogênio.

Um maior intervalo entre pulverizações foliares é desejável, desde que garanta um maior período de proteção contra o patógeno, portanto, é importante conhecer o limite aceitável desse intervalo. Nesse trabalho, períodos menores que 8 dias proporcionaram uma redução no controle do patógeno, portanto, entende-se que o ideal seriam aplicações com intervalos de aproximadamente 8 dias entre aplicações, quando as condições para ocorrência do CBC forem favoráveis. Para melhor integrar o uso dos biocontroladores às técnicas comuns dos produtores rurais, os quais frequentemente trabalham com calendários de pulverizações, seguindo uma periodicidade, o intervalo entre aplicações poderia ser adaptado para

7 dias, permitindo assim, que fossem realizadas pulverizações semanais, havendo à necessidade de proteção do cultivo.

A duração do efeito dos biocontroladores no controle do CBC mesmo após vários dias, nos dá um indicativo de que, ou os biocontroladores possuem um efeito de indução de resistência durável por um período de pelo menos 10 dias, mas que vai perdendo efeito ao longo desse período, ou de que os mesmos estejam sobrevivendo no filoplano, sendo a redução na efetividade do controle ao longo do tempo explicada por uma possível redução da população dos mesmos no mesófilo, em função da ação da radiação UV e baixa umidade. A sobrevivência dos biocontroladores no filoplano implicaria na possibilidade do mecanismo do controle por competição, em especial no caso do patógeno (XFF), tendo-se em vista a importância de populações do patógeno vivendo como epífitas no filoplano de folhas de feijão previamente a sua penetração via estômatos e hidatódios (RUDOLPH, 1993). No presente estudo, o período máximo entre aplicações foi de 10 dias, trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos com um maior intervalo de tempo entre aplicações e em condições de campo, devido à maior intensidade de fatores climáticos (precipitações, vento, radiação UV) que podem afetar na sobrevivência epifítica dos biocontroladores no filoplano (COSTA *et al.*, 2016), buscando identificar o período máximo de proteção proporcionado em situação de campo. Além disso, se torna importante um estudo da sobrevivência dos biocontroladores no filoplano, bem como a avaliação do potencial de competição dos mesmos.

Na literatura tem-se encontrado trabalhos mostrando um período de controle de até 20 dias pelo uso de fungicidas (CAMERA *et al.*, 2018), de 8 a 10 dias pelo uso de indutores químicos de resistência (PONTES *et al.*, 2016), porém quando se trata de controle biológico não se encontram trabalhos relacionados, sendo esse um estudo pioneiro nessa área.

Reiss e Jørgensen (2017), em trabalho testando diferentes números de aplicações e doses de *B.subtilis* (QST713), visando o controle de *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* em trigo, encontraram resultados que indicam que o aumento do número de aplicações desse biocontrolador proporcionaram maior controle do patógeno. No presente estudo, aplicações adicionais não resultaram em aumento do controle. Esse fato pode ser explicado pelo mecanismo de biocontrole associado, no nosso caso, por indução de resistência, conforme demonstrado em trabalhos anteriores (SANGIOGO *et al.*, 2018), e portanto o incremento no número de aplicações não

necessariamente resultaria em um maior controle. No entanto, caso fosse utilizado um intervalo entre aplicações maior, onde o efeito de controle proporcionado pelos tratamentos já fosse reduzido, possivelmente poderíamos observar o efeito de um maior número de aplicações.

Corroborando com os resultados do presente estudo, Borbae colaboradores (2019), em trabalho avaliando diferentes formas e intervalos de aplicações de extrato de algas (*Ulva fasciata*), verificaram uma redução significativa da severidade da murcha de Fusário (*Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*), utilizando o método de aplicação via pulverização foliar, independente do número de aplicações (de uma a três aplicações). Os autores justificaram a ausência de efeitos no número de aplicações a um possível efeito de indução de resistência, relatada em trabalhos anteriores (DELGADO; FREITAS; STADNIK, 2013; FREITAS; STADNIK, 2012).

Os resultados aqui apresentados indicam que o uso do líquido metabólico dos isolados biocontroladores proporcionou um controle semelhante à aplicação dos biocontroladores. Esses resultados, abrem novas possibilidades na formulação de um produto final, visto que a possibilidade do uso do líquido metabólico dos biocontroladores, sem a necessidade da viabilidade das células bacterianas em um produto final, facilita o desenvolvimento de produtos para uso comercial, uma vez que uma das maiores dificuldades na formulação de produtos com células vivas de microrganismos é manter a sua viabilidade por longos períodos em temperatura ambiente. Além disso, o uso do líquido metabólico de biocontroladores eliminaria o custo adicional no registro do produto comercial em casos em que o biocontrolador seja patogênico ao ser humano. O uso do líquido metabólico do biocontrolador também viabilizaria a possibilidade do uso do produto em situações em que o microrganismo não teria capacidade de sobreviver e colonizar a planta hospedeira, abrindo assim a possibilidade do uso do líquido metabólico de biocontroladores selecionados para outras culturas.

A eficiência do uso do líquido metabólico de bactérias no controle de doenças em plantas tem sido identificado com frequência (KÄLVÖ; MENKIS; BROBERG, 2018; YONGGANG *et al.*, 2019), inclusive no controle do agente causal do CBC (SPAGO *et al.*, 2014). Os mecanismos de ação envolvidos podem ser indução de resistência, antibiose direta, bem como competição pela produção de sideróforos (AKRAM; ANJUM; ALI, 2015; NAUREEN, *et al.*, 2015; YONGGANG *et al.*, 2019).

Os resultados aqui apresentados mostram que embora o líquido metabólico de todos isolados testados tenha sido capazes de reduzir o CBC, os mesmos não apresentaram atividade antagônica contra XFF, o que nos dá um indicativo de que o líquido metabólico desses isolados atua como indutor de resistência ao CBC. No entanto, cabe ressaltar, que o líquido metabólico produzido pelos biocontroladores foi coletado após 24 horas de crescimento em meio líquido, portanto, é possível que não tenha havido tempo hábil para acúmulo de quantidades suficientes de substâncias antimicrobianas no meio, bem como a necessidade da presença do patógeno para induzir a produção de determinados compostos antimicrobianos. Além disso, condições de crescimento de microrganismos em meio líquido, como pH, fontes de carbono do meio e temperatura, podem influenciar na produção de compostos antimicrobianos no meio (SLININGER; WILBUR, 1995). Portanto, trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos a fim de otimizar a produção do líquido metabólico dos isolados biocontroladores do presente trabalho, a fim de confirmar se de fato não há produção de compostos antimicrobianos por esses isolados.

Os resultados indicam que o uso do isolado DFs348 morto não é suficiente para controlar significativamente o CBC, provavelmente não havendo efeito de indução de resistência pelo uso dessa variação do tratamento biocontrolador, por outro lado, o uso do isolado vivo e de seu líquido metabólico foi capaz de reduzir a doença, podendo haver nesse caso efeito de indução de resistência, visto que o LM desse isolado não apresentou efeito antagônico ao patógeno e que o isolado DFs348 utilizado vivo não apresentou antibiose a isolados de XFF em trabalhos anteriores (CORRÊA, 2010). Nesse caso, percebe-se que apenas os componentes da célula bacteriana do isolado não foram suficientes para induzir a resistência, sendo provável que o elicitor seja algum composto produzido pela célula bacteriana. Componentes da célula bacteriana, como a flagelina, exopolissacarídeos (EPS) e lipopolissacarídeos (LPS), podem atuar como elicitores da resistência de plantas a patógenos (MEZIANE *et al.*, 2005; PATEL; SAYYED; SARAF, 2016), bem como compostos produzidos pela célula bacteriana, como por exemplo lipopolipeptídeos e sideróforos (RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; VAN LOON *et al.*, 2008).

Para os isolados DFs513, DFs769 e DFs831, todas formas de aplicação foram capazes de controlar o CBC. Considerando o fato de que líquido metabólico desses isolados não apresentou atividade antagônica ao patógeno e de que esses isolados não apresentaram antibiose direta frente a XFF em trabalhos anteriores

(CORRÊA, 2010), entende-se que esses tratamentos estejam induzindo resistência ao CBC, inclusive pela aplicação das células bacterianas mortas. Para esses isolados, a indução de resistência provavelmente não seja apenas pela produção de compostos específicos pela célula bacteriana, mas também pela presença de componentes da célula bacteriana, visto a indução de resistência ocorrer mesmo quando aplicadas suspensões das bactérias mortas. Como foi relatado anteriormente, componentes da célula bacteriana, como EPS, LPS e flagelina, podem atuar como indutores de resistência, o que pode explicar a indução de resistência provocada pelo uso de bactérias mortas no presente estudo.

O isolado DFs831 quando em mistura com quitina, apresentou um controle maior que a aplicação do isolado vivo e morto. Possivelmente esteja ocorrendo um efeito sinérgico do uso do biocontrolador associado à quitina, devido a ação de diferentes mecanismos de biocontrole, ou mesmo de diferentes rotas de indução de resistência. A hipótese de atuação de outro mecanismo de biocontrole associado, possivelmente antibiose, se sustenta mesmo na ausência de efeito do LM no patógeno *in vitro*, pois, deve-se considerar a possibilidade de não ter havido tempo hábil para a produção de quantidades suficientes de substâncias antimicrobianas no meio, ou da necessidade da presença do patógeno para induzir a produção de determinada substância antimicrobiana. Outro mecanismo de biocontrole que pode estar associado a esse efeito sinérgico do uso do biocontrolador associado à quitina é a competição, visto que o isolado DFs831 apresentou resultado positivo para a presença de diferentes genes responsáveis pela codificação de antibióticos, o que representa uma vantagem competitiva desse biocontrolado. Além disso, o isolado DFs831 é um produtor de sideróforos (FASOLIN, 2017), outro fator que pode ser considerado como uma vantagem competitiva do biocontrolador.

Espécies do gênero *Bacillus* são conhecidas por produzirem diversos lipopeptídeos com atividade antimicrobiana, incluindo bacilisina, iturina e surfactina (CHUNG *et al.*, 2008), tendo sido associados ao controle de diversos patógenos (CARRER-FILHO; DIANESE; CUNHA, 2015; SARWAR *et al.*, 2018; ZOHOHRA; ANO; RAHMAN, 2016). No presente trabalho, foram detectados os genes responsáveis pela codificação de Bacilisina, Bacillomicina-D, Iturina e Micosubilitina e Surfactina em ambos isolados do gênero *Bacillus* (exceto surfactina para DFs348). Esses polipeptídeos possuem ação antimicrobiana, atuando no antagonismo contra patógenos não só pela ação antimicrobiana direta (STEIN, 2005), mas também pela

indução de resistência (FUJITA; YOKOTA, 2019; KAWAGOE *et al.*, 2015; GARCÍA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2013).

Os biocontroladores do gênero *Pseudomonas* (DFs513 e DFs831), apresentaram os genes relacionados à codificação dos antibióticos 2,4-diacetylphloroglucinol, Ácido fenazina-1-carboxílico (C,D), Pirrolnitrina e Cianeto de hidrogênio para DFs831, para DFs513 foi detectado apenas o gene relacionado ao antibiótico 2,4-diacetylphloroglucinol. Esses compostos possuem reconhecida atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de patógenos (HASS; DÉFAGO, 2005), apresentando também efeito de indução de resistência de plantas a patógenos (GOTOR, *et al.*, 2019; BAKKER *et al.*, 2003).

Ambos isolados do gênero *Bacillus* (DFs348 e DFs769) e de *Pseudomonas* (DFs513 e DFs831) apresentaram efeito de indução de resistência ao CBC, até mesmo quando utilizado seu líquido metabólico, ou seja, ocorreu a indução de resistência mesmo na ausência da célula bacteriana, o que pode ser explicado, pela presença de genes responsáveis pela codificação de compostos antimicrobianos com reconhecida ação de indução de resistência.

Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos no sentido de estudar o período de proteção proporcionado pelos tratamentos biocontroladores, com células vivas, mortas e seu líquido metabólico, bem como o efeito de pulverizações adicionais, em condições de campo, utilizando intervalos maiores entre aplicação do biocontrolador e inoculação do patógeno. Havendo efeito no controle do CBC e confirmado o período de proteção proporcionado por esses tratamentos em condições de campo, deverão ser estudadas técnicas de formulação desses tratamentos, seja com bactérias vivas, mortas, ou seu líquido metabólico, para que, havendo viabilidade técnica e econômica, esses tratamentos possam ser registrados e formulados comercialmente.

## **2.4 Conclusões**

- Ostratamentos biocontroladores DFs513, DFs769 e combinação C03 reduzem a severidade e incidência inicial do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro.
- Intervalos entre aplicações do biocontrolador e do patógeno inferiores a 8 dias resultam em maior controle do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro.

- O número de pulverizações de biocontroladores não interfere no controle do crescimento bacteriano comum do feijoeiro.
- O líquido metabólico dos tratamentos biocontroladores DFs348, DFs513, DFs769e DFs831 controlam o crescimento bacteriano comum do feijoeiro.
- Os todos biocontroladores testados possuem genes relacionados pela codificação de compostos antimicrobianos.

### **3 Capítulo 2 – Tratamento de sementes e proteção de flores pela pulverização de bactérias biocontroladoras reduza transmissão de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* em sementes e plântulas de feijão**

#### **3.1 Introdução**

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de significativa importância econômica e social do Brasil, principalmente em pequenas propriedades rurais, pois a maior parte da produção nacional é oriunda da agricultura familiar (BRASIL, 2015). No entanto, a produtividade média do feijão é considerada baixa, segundo estimativas da CONAB (2019a), na safra 2018/2019 a produtividade média do país foi de 1042 kg ha<sup>-1</sup>, frente a um potencial produtivo da maioria das cultivares existentes no mercado que é maior que 4000 kg ha<sup>-1</sup> (GUERRA; SILVA; RODRIGUES, 2000).

Dentre as causas para a baixa produtividade da cultura do feijoeiro tem-se a alta sensibilidade dessa cultura a doenças, dentre essas, destaca-se o cretamento bacteriano comum do feijoeiro (CBC), ocasionado pelas bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP) e *X. fuscans* subsp. *fuscans* (XFF) (sin. *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*). No Brasil, estimativas de danos ocasionados pelo CBC de 4,8% a 40,7% tem sido registradas, variando em função dos genótipos testados (WENDLAND *et al.*, 2010). Reduções em produtividade superiores a 40% também tem sido registradas em outros países (SINGH; MIKLAS, 2015).

As formas de sobrevivência dos agentes causais do CBC nas entressafras da cultura do feijão incluem, infecção ou epifitismo em plantas invasoras de diferentes espécies, sobrevivência em restos de cultura e em sementes (BIANCHINI;



MARINGONI; CARNEIRO, 2005; KARAVINA *et al.*, 2011; SCHAAD, 1982; TORRES; MARINGONI; SILVA, 2009).

Após penetração do patógeno na planta pelo patógeno, o mesmo pode desenvolver uma infecção sistêmica através do sistema vascular, atingindo as vagens, infectando a semente através do funículo ou pelo micrópilo, confinando-se geralmente no tegumento da semente. A penetração direta do patógeno em sementes não tem sido observada, podendo ocorrer a infestação das sementes (superfície das sementes), em caso do desenvolvimento lesões em vagens (ZAUMEYER; THOMAS, 1957). Portanto, a semente é o principal meio de sobrevivência e disseminação do patógeno, podendo a bactéria se localizar no interior, na superfície, bem como acompanhando as sementes (SCHUSTER; COYNE, 1974; ZAUMEYER; THOMAS, 1957). Os dados de sobrevivência do patógeno em sementes são muito variáveis, indicando que a mesma possa sobreviver de dois a quinze anos infectando sementes (BURKHOLDER, 1921; SCHUSTER; SAYRE, 1967; WALLEN; GALWAY, 1979; ZAUMEYER; THOMAS, 1957).

Wallen e Sutton (1965) verificaram que 0,5% de sementes transportando o patógeno foram suficientes para ocorrência de epidemia da doença no Canadá. Já em Uganda, Opió (1993) constatou que 0,2% de sementes infectadas foram suficientes para ocasionar severas epidemias. No Brasil, o Grupo Técnico Permanente em Patologia de Sementes, estabeleceu o nível de tolerância de 0% para o agente causal do CBC (HENNING, 2005). Por outro lado, a população mínima para iniciar a infecção na planta varia de  $10^2$  a  $10^3$  Unidades Formadoras de Colônias por semente (UFC/semente), podendo variar conforme as condições de temperatura e umidade do ambiente (OPIO *et al.*, 1993; DARRASSE *et al.*, 2007).

Os testes de sanidade de sementes tem um papel importante no monitoramento de lotes de sementes, pois sementes de feijão transportando XFF ou XAP podem ser assintomáticas (CAFATI; SAETTLER, 1980). Dentre as técnicas de detecção de fitobactérias em sementes, estão o cultivo de sementes em meio semi-sólido, semeio de extrato de sementes em meios seletivos ou semi-seletivos, plantio direto das sementes em substrato esterilizado, inoculação de extrato de sementes em plantas suscetíveis, ELISA, métodos moleculares baseados na Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), imunofluorescência, uso de bacteriófagos,

entre outros. No entanto estas devem combinar a sensibilidade com a especificidade (GITAITIS; WALCOTT, 2007; SAETTLER *et al.*, 1989). Os métodos de detecção de XFF e XAP, indicados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) incluem o semeio de extrato de sementes em meios semi-seletivos, detecção por PCR e por inoculação em hospedeiro susceptível (BRASIL, 2009). No entanto, esses métodos não permitem quantificar a transmissão do patógeno das sementes para as plântulas, assim torna-se importante o uso da técnica do plantio direto das sementes em substrato esterilizado, uma vez que essa técnica é capaz de fornecer essa informação. Adicionalmente, outra metodologia de detecção de XFF e XAP é o método proposto por Valarini e Menten (1992), onde se combinam as técnicas de semeio de extrato de sementes em meio semi-seletivo e inoculação em hospedeiro susceptível, dando uma estimativa do Número Mais Provável (NMP) de sementes portadoras do patógeno.

O desenvolvimento de tecnologias que proporcionem uma produção de sementes livres do patógeno, ou tratamentos de sementes que evitem sua transmissão para as plântulas são um ponto chave no controle do CBC, uma vez que a principal forma de disseminação do patógeno é por meio das sementes, que os níveis de incidência necessários para ocorrência de epidemias de CBC são baixos, aliado a isso, a ocorrência do patógeno em lotes de sementes do país já é conhecida, estudos tem indicado que a ocorrência de lotes transportando XFF e XAP variam de 8 a 50% (VALARINI; SPADOTTO, 1995; TORRES; SILVA JUNIOR; MARINGONI, 2009).

O tratamento de sementes com antibióticos tem efeito apenas na desinfestação das sementes, não tendo efeito curativo quando a bactéria encontra-se localizada internamente (AGROFIT, 2019). Nesse sentido, o uso de bactérias biocontroladoras no tratamento de sementes visando o controle do patógeno se torna uma estratégia interessante.

A maioria dos trabalhos buscando o biocontrole utilizam a microbiolização de sementes como forma de dispensar as bactérias nas plantas (CORRÊA *et al.*, 2014; FIGUEREDO *et al.*, 2014; PLANCHAMP *et al.*, 2015). Outros trabalhos comprovam a redução da transmissão de patógenos para as plântulas pelo tratamento de sementes com bactérias biocontroladoras (CORRÊA, *et al.*, 2008; FESSEHAIE; WALCOTT, 2005; MELO, *et al.*, 2016). Por outro lado, não foram encontrados

trabalhos em que utilizam tratamento de sementes com bactérias biocontroladoras em sementes infectadas ou infestadas com XFF e/ou XAP.

Embora o uso de biocontroladores no tratamento de sementes transportando o patógeno seja uma estratégia promissora no controle do CBC, seria ainda mais interessante a produção de sementes livres do patógeno. Nesse sentido, Fessehaie e Walcott (2005) realizaram estudo em que a aplicação de biocontroladores foi realizada nas flores de melancia, reduzindo a incidência do patógeno *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* nas sementes produzidas pelas plantas tratadas. Essa é uma estratégia de controle inédita e de grande potencial de uso em campos de produção de sementes, em que por meio do tratamento das plantas mãe se produz sementes mais saudáveis. Não foram encontrados outros trabalhos com estratégia semelhante, portanto, a seleção de bactérias biocontroladoras na produção de sementes de feijão saudáveis é algo inédito e de impacto no manejo do CBC.

Trabalhos anteriores mostraram que pulverizações foliares dos biocontroladores DFs513, DFs769 e combinação C03 controlam o CBC quando aplicadas previamente à inoculação do patógeno nas folhas (SANGIOGO *et al.*, 2018), no entanto, não se sabe qual seria o efeito desses biocontroladores na transmissão do patógeno para as sementes produzidas por essas plantas tratadas e nem mesmo seu efeito no tratamento de sementes naturalmente infectadas/infestadas pelo patógeno.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do uso de bactérias biocontroladoras para o tratamento de sementes que transportam XFF e avaliar o efeito da pulverização de bactérias biocontroladoras em plantas de feijão em estágio de floração na sanidade das sementes produzidas.

## **3.2 Material e métodos**

Os ensaios foram realizados na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), no município de Capão do Leão, entre o período de 2015 e 2019.

### **3.2.1 Microrganismos utilizados e sua manutenção**

Os isolados bacterianos que foram utilizados (Tabela 1) são pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade

(DFs) da UFPel. Essas bactérias, foram selecionadas para o controle do crestamento bacteriano comum do feijão quando microbiolizadas em sementes (CORRÊA, 2007; ZANATTA *et al.*, 2007) e em pulverização foliar (SANGIOGO *et al.*, 2018). A bactéria patogênica utilizada foi *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF) isolado XFF28 anteriormente denominada *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (XAP28), cedido pela Embrapa Clima Temperado (Embrapa CPACT). A virulência da bactéria foi monitorada utilizando o método de inoculação da folha por corte com tesoura, conforme descrito por Dhingra e Sinclair (1995).

Tabela 1 - Identificação e origem das bactérias utilizadas isoladamente e em combinação para o biocontrole de doenças do feijão.

Isolados	Identificação <sup>1</sup>	Local de isolamento
DFs348	<i>Bacillus cereus</i> Frankland & Frankland	Folha de cebola
DFs513	<i>Pseudomonas veronii</i> Elomari	Túnica de cebola
DFs769	<i>B. cereus</i> Frankland & Frankland	Vagem de feijão
DFs831 <sup>2</sup>	<i>P. fluorescens</i> Migula	Solo rizosférico de feijão
C03 <sup>3</sup>	DFs348+DFs769+DFs831	

<sup>1</sup> Determinados por sequenciamento do gene 16S rDNA (dados não publicados).

<sup>2</sup> Isolado utilizado apenas em combinação.

<sup>3</sup> Combinação selecionada por SANGIOGO *et al.*(2018).

Os isolados bacterianos foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), em geladeira a 4 °C. O isolado de XFF28 foi também preservado em tubos de ensaio contendo meio GYCA (SWINGS; VAUTERIN; KERSTERS, 1993). A longo prazo, os isolados foram preservados em óleo, em glicerol e em solo (ROMEIRO, 2001).

### 3.2.2 Experimento I: Efeito do tratamento de sementes naturalmente transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli* com bactérias biocontroladoras

Dois lotes de sementes de feijão, cultivar CNFP11976 – Lambari, safra 2015/2016, produzidas em experimento da Universidade Federal de Lavras, cedidas pelo Professor Dr. Ricardo Magela de Souza, provenientes de plantas com incidência de CBC foram utilizadas nesse experimento.

### 3.2.2.1 Tratamento das sementes com bactérias biocontroladoras

Os isolados biocontroladores DFs348, DFs513, DFs769 e DFs831 foram cultivados em meio 523 de Kado e Heskett (1970) por 24 horas, após foram preparadas suspensões com solução salina (NaCl 0,85%) para cada um dos isolados sendo as suas concentrações ajustadas para  $A_{540} = 0,50$ . A combinação dos isolados foi constituída por 20 mL de suspensão de cada um dos isolados (DFs348, DFs769 e DFs831), cujas concentrações foram individualmente ajustadas para  $A_{540} = 0,50$ , constituindo a combinação C03

O tratamento das sementes de feijão com os isolados biocontroladores foi realizado a partir do acondicionamento das sementes em sacos plásticos (5 L), sobre as quais foram adicionados 3,5 mL de suspensão dos tratamentos biocontroladores (DFS513, DFS769, C3) e na testemunha somente solução salina. O saco foi agitado por aproximadamente 5 min, até que todas as sementes estivessem homogeneamente cobertas pelos tratamentos. Após, as sementes foram colocados em câmara de fluxo laminar por três horas para secagem das sementes.

### 3.2.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Foi utilizada metodologia baseada naquela descrita por Valarini e Menten (1990). As sementes de feijão foram separadas em 5 subamostras de 10 sementes, e 5 subamostras de 100 sementes, por tratamento. Utilizando Erlenmeyer de 50 mL para as subamostras de 10 sementes e de 250 mL para subamostras de 100 sementes, as sementes foram imersas em água esterilizada, sendo nas subamostras de 10 sementes, adicionados 10 mL de água, e nas subamostras de 100 sementes, 40 mL. Os frascos foram mantidos em geladeira a 4 °C por 18 horas, e retirados 1 h antes de proceder à inoculação em vagem e semeio em meio GYCA.

Foram inoculadas duas vagens de feijão para cada subamostra. As vagens foram previamente perfuradas com uma ponteira de 100 µL (3 a 5 mm de profundidade), realizando dois furos por vagem, onde foram depositados 20 µL do extrato das sementes. As vagens foram acondicionadas em caixas do tipo gerbóx,

sobre papel absorvente umedecido, mantidas em BOD a  $28 \pm 2$  °C. Após 48 horas, as vagens foram analisadas quanto à presença de sintomas de anasarca e necrose ao redor das perfurações, sendo esse sintoma característico da presença do patógeno.

Para o semeio em placas, foi utilizado o meio de cultura GYCA, sendo duas placas para cada subamostra. Em cada placa, foram distribuídos 10 µL da diluição  $10^{-1}$  a partir do extrato das sementes em quatro pontos em cada, por cada subamostra. Após a repicagem, as placas foram incubadas sob temperatura de  $28 \pm 2$  °C, no escuro, por 72 horas. O reconhecimento das colônias de XFF e XAP em meio GYCA foi feita por observação direta de colônias típicas do patógeno, sendo elas amarelas, mucoides, bordas lisas, circulares.

Uma única anasarca ou necrose nas vagens ou colônia de XFF ou XAP nas placas, implicou em resultado positivo para presença do patógeno na amostra. Os resultados foram expressos como número de amostras positivas ou negativas, interpretados pelo método do NMP (Cochran, 1950), seguindo a tabela descritiva por Swaroop (1951) (Anexo B), fornecendo um resultado final em porcentagem de sementes transportando o patógeno.

### **3.2.2.3 Determinação da população de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* transportadas pelas sementes**

Foi seguida metodologia descrita pelo Manual de Análise Sanitária de Sementes, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009), resumidamente descrita a seguir. Em um Erlenmeyer de 1 L, 500 sementes de feijão foram imersas em 200 mL de água esterilizada. Os frascos foram mantidos em geladeira a  $4 \pm 2$  °C por 18 horas e retirados 1 hora antes de proceder o plaqueamento. O Erlenmeyer foi agitado, e então feitas as diluições em série do extrato de sementes ( $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ). Foram então semeados 100 µL das diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  e do extrato não diluído, em placas do meio GYCA (4 repetições), espalhados sobre a superfície. As placas foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C no escuro, e após três dias realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na placa.

### **3.2.2.4 Análise da transmissão do patógeno das sementes para plântulas de feijão**

As sementes já microbiolizadas com os isolados biocontroladores, conforme descrito no item 3.2.2.1, foram semeadas individualmente em recipientes (50 mL) com vermiculita estéril, e acondicionados em caixas de plástico (45 L) para proporcionar condições de câmara úmida, e mantidas em casa de vegetação. A irrigação realizada de forma manual, em cada recipiente individualmente, com uma pisseta, em quantidade suficiente para manter o substrato úmido, porém sem causar percolação da água para fora dos recipientes, com finalidade de evitar a disseminação do patógeno entre recipientes.

Entre 15 a 20 dias após o semeio, período que variou em função do aparecimento dos sintomas nas folhas cotiledonares, foi analisada a emergência das sementes e transmissão do patógeno para as plântulas através da observação direta dos sintomas e confirmação por observação da exsudação em microscópio. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas com patógeno.

O experimento foi montado em um delineamento interamentecasualizado, onde as parcelas experimentais consistiram em subamostras de 12 sementes, em oito repetições, em dois ensaios repetidos no tempo.

### **3.2.3 Experimento II: Efeito da pulverização de bactérias biocontroladoras em plantas de feijão em floração na transmissão de XFF para as sementes e sua transmissão para plântulas**

Plântulas de feijão preto comum, cultivar BRS Valente foram pré-germinadas em caixas do tipo gerbox, sob papel filtro umedecido, mantidas em BOD a  $25 \pm 2$  °C por sete dias, após os quais foram transplantadas (duas por vaso). As plantas foram conduzidas em vasos com capacidade para 2 kg, em uma mistura solo e substrato comercial não esterilizado (2:1), mantidas em casa de vegetação, com irrigação diária diretamente no colo da planta, sem aspergir as folhas.

Quando as plantas atingiram o estágio de floração plena foram pulverizadas suspensões dos tratamentos biocontroladores (DFs513, DFs769 e C03), preparadas conforme descrito no item 3.2.2.1. Após 48 horas, as plantas foram pulverizadas com suspensão do patógeno (XFF28), e mantidas em câmara úmida por 24 horas. A

concentração das suspensões dos biocontroladores foi ajustada em espectrofotômetro para  $A_{540} = 0,4$ , já para o patógeno (XFF),  $A_{540} = 0,2$ .

As plantas foram conduzidas até o ponto de colheita, quando as sementes foram colhidas e armazenadas em geladeira até análise. Para determinação da transmissão do patógeno para as sementes produzidas, foi realizada a análise individual de 40 sementes por tratamento, uma vez que o número de sementes era limitado devido à baixa produção de sementes. Para tanto, cada semente foi posta em um tubo de ensaio (5 mL), contendo 1 mL de água estéril. Os tubos foram mantidos em geladeira a 4 °C por 18 horas, e retirados 1 hora antes de proceder à inoculação em vagem e semeio em meio GYCA, conforme descrito no item 3.2.2.2. Para determinação da população de XFF nas sementes, foi reunido o volume de 10 tubos, compondo uma amostra, a diluição, plaqueamento e contagem foi realizada conforme descrito em 3.2.2.3. A análise da transmissão do patógeno das sementes para as plântulas, foi realizado conforme descrito no item 3.2.2.4, utilizando oito repetições, em que cada repetição foi composta por uma subamostra de 10 sementes. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições, em dois ensaios repetidos no tempo.

### **3.2.4 Experimento III: Efeito da pulverização foliar em campo com ocorrência natural de Crestamento Bacteriano Comum na sanidade de sementes de feijão**

O experimento foi conduzido no Centro Agropecuário da Palma/UFPel, coordenadas geográficas Latitude: -31.807513, Longitude: -52.479407, no período de dezembro de 2016 a março de 2017. A semeadura do feijão foi feita com semeadeira manual do tipo “Pica-Pau”, com uma densidade de 250000 plantas ha<sup>-1</sup>, espaçamento entre linhas de 0,45 m e profundidade de plantio de aproximadamente 0,03 m. A adubação foi calculada em função dos resultados de análise de solo, conforme manual de adubação e calagem para o estado do Rio Grande do Sul (REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLO E DE TECIDO VEGETAL - ROLAS, 2004). Foi realizada capina manual pré e pós plantio. Foi utilizada a cultivar de feijão BRS Exedito.

Os tratamentos consistiram na pulverização foliar de suspensões dos tratamentos biocontroladores DFs769 e C03, como testemunha, foi utilizado água estéril. As pulverizações foram realizadas com pulverizador costal, sendo utilizada a



concentração  $A_{540} = 0,4$ , com volume de calda de  $150 \text{ L ha}^{-1}$ , sendo realizadas duas pulverizações, com 20 dias entre as mesmas, com primeira pulverização no estágio R6 (floração) e segunda pulverização no estágio R8 (enchimento de grãos).

Ao final do ciclo toda a produção foi colhida e as sementes armazenadas em geladeira para análise. A determinação do NMP de sementes de feijão transportando XFF e determinação da população de XFF nas sementes, foi realizado conforme descrito nos itens 3.2.2.2, 3.2.2.3. A análise da transmissão do patógeno das sementes para as plântulas foi feita conforme descrito no item 3.2.2.4, com exceção para o número de sementes que compôs a parcela, que nesse ensaio foi de 24 sementes. O ensaio foi montado em um delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições.

### **3.2.5 Análises estatísticas dos dados**

Para os dados de contagem de células bacterianas, transmissão e germinação foi realizada análise pelo teste de Kruskal-Wallis, e havendo significância no teste, os tratamentos foram comparados usando o método de Fisher (CONOVER, 1999). O nível de significância considerado foi de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no software R 3.5.1 (2018), utilizando os pacotes agricolae (MENDIBURU, 2017) e openxlsx 4.1.0 (WALKER, 2018).

Embora os experimentos tenham sido repetidos no tempo, por tratarem-se de experimentos conduzidos em condições controladas, apresentando resultados semelhantes entre réplicas, foram apresentados os dados do ensaio com menor variação dos dados.

## **3.3 Resultados e Discussão**

Sementes transportando o patógeno são uma importante fonte de inóculo inicial e principal forma de disseminação dos agentes causais do CBC, assim, a seleção de bactérias biocontroladoras capazes de eliminar a população do patógeno, bem como sua transmissão para plântulas em lotes de sementes naturalmente infectadas/infestadas com o patógeno se torna uma importante ferramenta no manejo do CBC. Nesse contexto, o experimento I avaliou o efeito do uso de bactérias biocontroladoras no tratamento de sementes naturalmente

transportando XFF e/ou XAP (Figura 1). Verificou-se que as sementes provenientes do tratamento controle (água estéril) apresentaram os maiores números de sementes com presença do patógeno nos dois lotes avaliados, chegando a extrapolar os limites da tabela de avaliação do NMP no lote 1 (Tabela 2). O tratamento com o biocontrolador DFs769 apresentou os menores números de sementes transportando XFF e/ou XAP na avaliação realizada com inoculação em vagens, nos dois lotes analisados. Os tratamentos com os tratamentos DFs513 e C03, apresentaram reduções na incidência de sementes transportando o patógeno em ambos lotes quando à avaliação foi feita com inoculação em vagens.

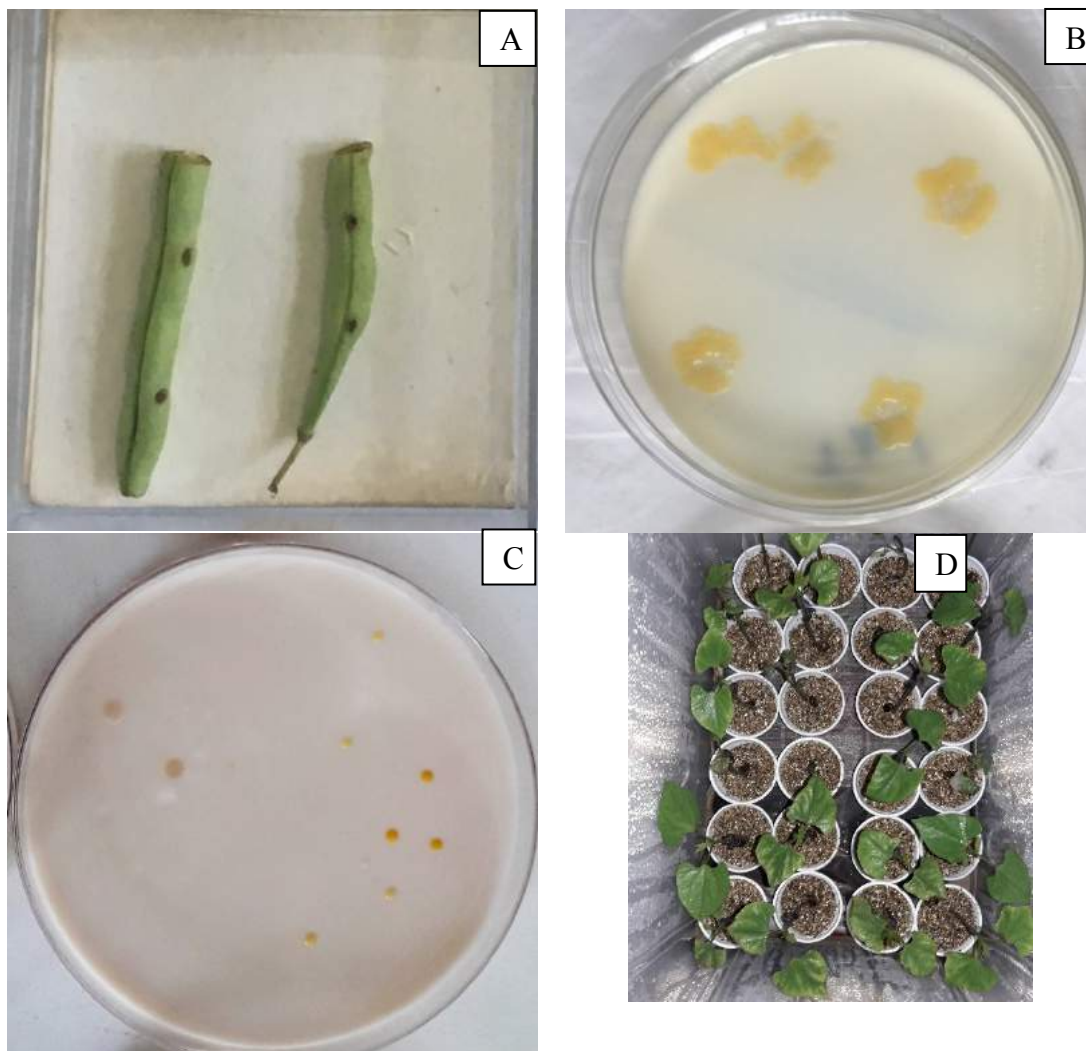


Figura 1 – Detecção de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli* bem como sua população, em sementes de feijão e transmissão para plântulas, por meio de inoculação do extrato das sementes em vagens (A), semeio em meio de crescimento (B), contagem em placa (C) e análise da transmissão em plântulas (D).

Tabela 2 - Número de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua população em lotes de sementes de feijão comum cv. CNFP11976 – Lambari, safra 2015/2016, tratadas com diferentes tratamentos biocontroladores.

Tratamentos	Lote 1		
	NMP – Vagens <sup>1</sup>	NMP – Placas <sup>2</sup>	UFC/Semente <sup>3</sup>
Controle	>16,1 <sup>4</sup> (3,9 - >45 <sup>5</sup> )	3,5 (1,2 – 10,1)	2,287 x 10 <sup>3</sup> a <sup>6</sup>
DFs513	16,1 (3,9 - >45)	3,5 (1,2 – 10,1)	0,307 x 10 <sup>3</sup> c
DFs769	1,4 (0,4 – 3,4)	1,2 (0,3 – 2,8)	0,517 x 10 <sup>3</sup> bc
C03	16,1 (3,9 - >45)	9,2 (9,2 – 21,7)	0,825 x 10 <sup>3</sup> ab
Lote 2			
Controle	16,1 (3,9 - >45)	16,1 (3,9 - >45)	3,020 x 10 <sup>3</sup> a
DFs513	2,1 (0,6 – 6,6)	16,1 (3,9 - >45)	1,500 x 10 <sup>3</sup> ab
DFs769	1,2 (0,3 – 2,8)	2,8 (0,9 – 8,5)	1,620 x 10 <sup>3</sup> ab
C03	1,4 (0,4 – 3,4)	0,3 (0,05 – 0,8)	0,495 x 10 <sup>3</sup> b

<sup>1</sup>Número Mais Provável (NMP) de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF) e/ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP), em teste realizado por inoculação do extrato de sementes em vagens.

<sup>2</sup>NMP de sementes transportando XFF e/ou XAP, em teste realizado por semeio do extrato de sementes em meio de cultura.

<sup>3</sup>Contagem de Unidades Formadoras de Colônias de XFF e/ou XAP por semente (UFC/semente)

<sup>4</sup>Valores de NMP extrapolaram valores da tabela de Swaroop (1951).

<sup>5</sup>Entre parênteses limites inferior e superior, em um intervalo de confiança de 95%.

<sup>6</sup>Tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher.

Controle (água estéril); DFs513 (*Pseudomonas veronii*); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03 [DFs348 (*B. cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)].

Nas avaliações em placas, o tratamento com o isolado DFs769 se confirmou como o que proporcionou redução considerável no NMP de sementes transportando o patógeno. Essa redução na porcentagem de sementes transportando o patógeno também foi observada nos tratamentos DFs513 e C03, no lote 2, o que não se repetiu no lote 1, portanto, a instabilidade do controle, comprovado pela ausência de continuidade do controle entre os lotes 1 e 2, torna esses tratamentos inferiores em comparação ao tratamento com o isolado DFs769, o qual se mostrou mais estável.

Os tratamentos com biocontroladores DFs513, DFs769 e C03, reduziram a população média do patógeno, no lote 1, em 86,5%, 77,37% e 63,9%, respectivamente, sendo que os tratamentos DFs513 e DFs769 diferiram significativamente da testemunha (Tabela 2). No lote 2, os tratamentos com os tratamentos biobontroladores DFs513, DFs769 e C03, reduziram a população média do patógeno em 50,3%, 46,3% e 83,6%, no entanto, apenas o tratamento C03 diferiu significativamente da testemunha.

Não foi observado efeito significativo dos tratamentos de sementes com os biocontroladores na emergência das plântulas em ambos os lotes (Figuras 2A e 4B). No entanto, os tratamentos DFs769 e C03 proporcionaram uma redução significativa na transmissão de XFF para as plântulas no lote 1 (Figura 2C). O tratamento

DFS513 mostrou tendência a reduzir a transmissão do patógeno, porém mesmo não diferiu significativamente da testemunha em ambos lotes. No lote 2 (Figura 2D), o único tratamento capaz de reduzir significativamente a incidência do patógeno foi o isolado DFs769.

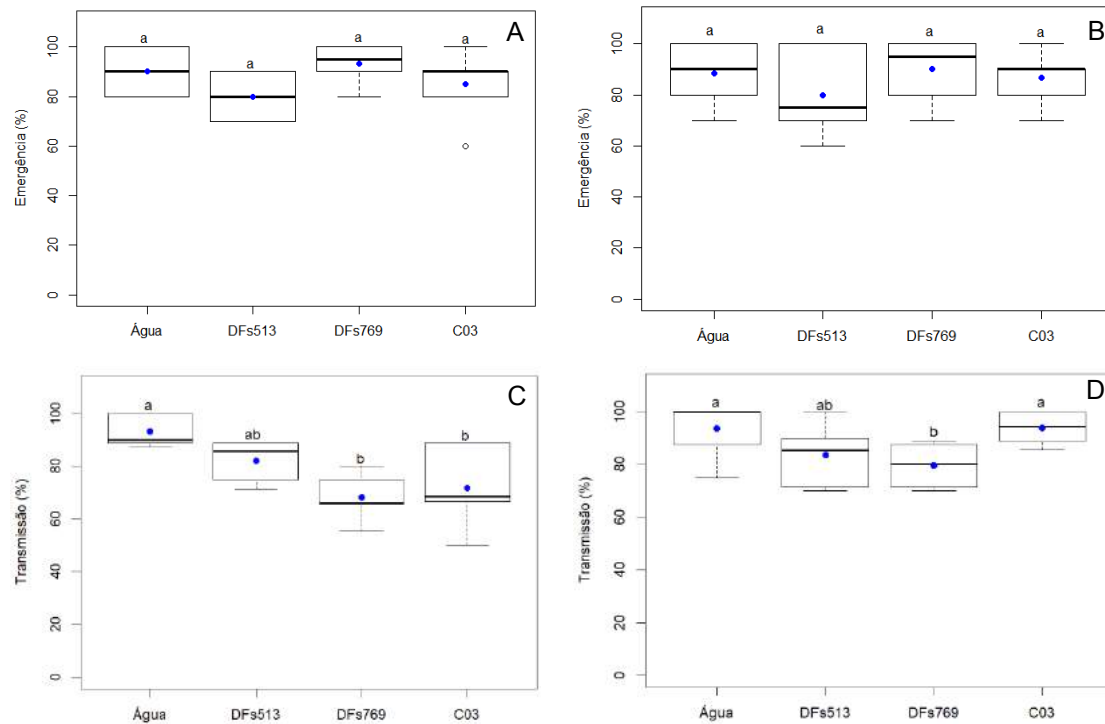


Figura 2 –Emergência de plântulas de feijão de dois lotes de sementes de feijão da cultivar CNFP11976, naturalmente infectadas/infestadas por *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, lote 1 (A) e lote 2 (B), e transmissão do patógeno de sementes para plântulas, lote 1 (C) e lote 2 (D). Sementes foram microbiolizadas com os tratamentos biocontroladores DFs513 (*Pseudomonas veronii*), DFs769 (*Bacillus cereus*), C03 [DFs348 (*Bacillus cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)], Água (controle negativo). Médias representadas por pontos em azul, medianas pelo traço na horizontal. Medianas seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher, a 5% de probabilidade.

No experimento I, foi mostrado que o tratamento de sementes transportando XFF e/ou XAP com bactérias biocontroladoras foi capaz de reduzir a incidência de sementes transportando o patógeno, bem como a população cultivável do patógeno nas sementes, o que resultou em uma menor transmissão do patógeno para as plântulas oriundas dessas sementes. No experimento II, foi testada outra estratégia de controle do CBC com foco na produção de sementes saudáveis. Nesse ensaio, foi estudado o efeito da pulverização de bactérias biocontroladoras em plantas de feijão em estágio de floração (R6), seguido da inoculação do patógeno (*X. fuscans* subsp. *fuscans*), na transmissão do patógeno para as sementes produzidas e na transmissão das sementes para as plântulas.

Os tratamentos influenciaram a transmissão de XFF para as sementes produzidas. Todos os tratamentos proporcionaram uma redução no número de sementes transportando o patógeno, avaliado em placas e vagens (Tabela 3). Nesse experimento, não foi estimado o NMP de sementes transportando o patógeno, uma vez que a produção de sementes foi limitada, devido à baixa produção de sementes, motivada, possivelmente pela alta incidência do patógeno nas plantas mãe. A população do patógeno diminuiu significativamente para o tratamento DFs513, para os demais tratamentos, embora exista uma tendência na redução da população bacteriana, os mesmos não diferiram significativamente da testemunha.

Tabela 3 – Número de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e sua população em sementes de feijão comum cv. BRS Expedito, oriundas de plantas pulverizadas com diferentes tratamentos biocontroladores em época de floração.

<b>Tratamentos</b>	<b>Incidência - Vagens (%)<sup>1</sup></b>	<b>Incidência - Placas (%)<sup>2</sup></b>	<b>UFC/semente<sup>3</sup></b>
<b>Controle</b>	45,00	10,00	4,225 x 10 <sup>3</sup> a <sup>4</sup>
<b>DFs513</b>	15,00	2,50	0,800 x 10 <sup>3</sup> b
<b>DFs769</b>	22,50	2,50	1,257 x 10 <sup>3</sup> ab
<b>C03</b>	22,50	5,00	1,600 x 10 <sup>3</sup> ab

<sup>1</sup>Porcentagem de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF), em teste realizado por inoculação do extrato de sementes em vagens.

<sup>2</sup>Porcentagem de sementes transportando XFF, em teste realizado por semeio do extrato de sementes em meio de cultura.

<sup>3</sup>Contagem de Unidades Formadoras de Colônias de XFF por semente (UFC/semente).

<sup>4</sup>Tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher.

Controle (água estéril); DFs513 (*Pseudomonas veronii*); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03 [DFs348 (*B.cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)].

No experimento II, não foi observado efeito significativo dos tratamentos na emergência de sementes (Figura 3 A). Em análise da transmissão do patógeno das sementes para as plântulas, percebe-se que a pulverização dos tratamentos DFs769 e C03 proporcionaram uma redução significativa na transmissão. O tratamento DFs513, embora não tenha diferido dos tratamentos DFs769 e C03, também não diferiu da testemunha (Figura 3B).

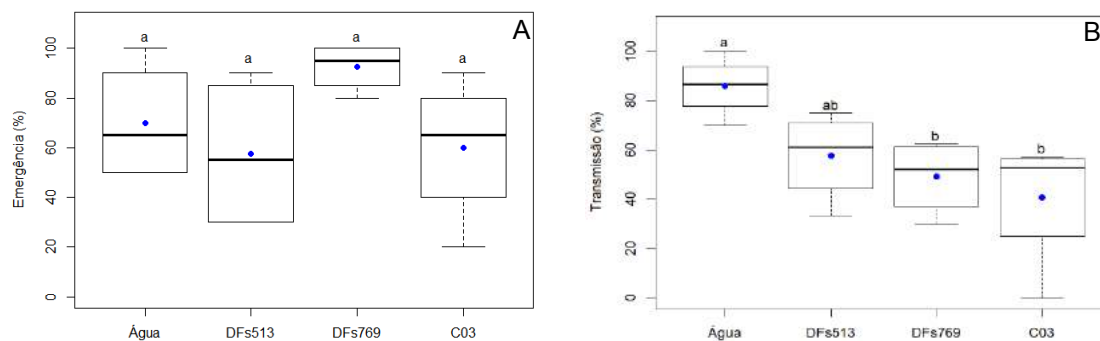


Figura 3 - Emergência de plântulas (A) e transmissão de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* para plântulas (B). Sementes de feijão cv. BRS Expedito, oriundas de plantas pulverizadas com diferentes tratamentos biocontroladores em época de floração. DFs513 (*Pseudomonas veronii*), DFs769 (*Bacillus cereus*), C03 [DFs348 (*B. cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)], Água (controle negativo). Médias representadas por pontos em azul, medianas pelo traço na horizontal. Medianas seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher, a 5% de probabilidade.

No experimento III, utilizaram-se sementes da cv. BRS Expedito, oriundas de experimento a campo, realizado na safra 2016/2017, onde as plantas de feijão foram pulverizadas com os tratamentos biocontroladores DFs769 e C03. Foi estudado o efeito dos tratamentos na transmissão do patógeno para as sementes, sua população e transmissão para as plântulas. Na condução desse experimento a campo, foi constatada a incidência generalizada de CBC em alta severidade em todas parcelas, sendo o patógeno isolado e identificado como XFF, uma vez que o mesmo apresentou produção de melanina em meio sólido. A ocorrência natural de XFF na área resultou em uma alta incidência do patógeno nas sementes, como poder ser visto na Tabela 4. Os tratamentos DFs769 e C03 foram capazes de reduzir a incidência de sementes transportando XFF. Em análise da população do patógeno nas sementes, revelado em placas e vagens, nota-se que o tratamento DFs769 foi capaz de reduzir a população do patógeno nas sementes significativamente, diferindo da testemunha e de C03.

A redução na incidência e na população de XFF nas sementes produzidas, se traduziu em uma menor transmissão do patógeno das sementes para as plântulas oriundas das mesmas (Figura 4B), os tratamentos biocontroladores DFs769 e C03 reduziram significativamente a transmissão do patógeno para as plântulas. Em ambas réplicas do experimento, não foi observado efeito significativo dos tratamentos na emergência de sementes (Figura 4A).

Tabela 4 -Número de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e sua população em sementes de feijão comum cv. BRS Exedito, safra 2016/2017, oriundas de plantas pulverizadas com diferentes tratamentos biocontroladores em condições de campo.

Tratamentos	NMP– Vagens <sup>1</sup>		NMP– Placas <sup>2</sup>	UFC/semente <sup>3</sup>
<b>Controle</b>	16,1 (4,6 – 44,6) <sup>4</sup>	>16,1 <sup>5</sup> (4,6 – 44,6)		6,435 x10 <sup>4</sup> a <sup>6</sup>
<b>DFS769</b>	0,9 (0,3 – 2,3)	2,2 (0,8 – 5,2)		2,085 x10 <sup>4</sup> b
<b>C03</b>	1,8 (0,7 – 3,8)	0,9 (0,3 – 2,3)		7,935 x10 <sup>4</sup> a

<sup>1</sup>Número Mais Provável (NMP) de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* (XFF)e/ou *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP), em teste realizado por inoculação do extrato de sementes em vagens.

<sup>2</sup>NMP de sementes transportando XFF e/ou XAP, em teste realizado por semeio do extrato de sementes em meio de cultura.

<sup>3</sup>Contagem de Unidades Formadoras de Colônias de XFF e/ou XAP por semente (UFC/semente)

<sup>4</sup>Entre parênteses limites inferior e superior, em um intervalo de confiança de 95%.

<sup>5</sup>Valores de NMP extrapolaram valores da tabela de Swaroop (1951).

<sup>6</sup>Tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher.

Controle (água estéril); DFs769 (*Bacillus cereus*); C03 [DFs348 (*B. cereus*) + DFs769 + DFs831 (*Pseudomonas fluorescens*)].

De uma maneira geral, percebe-se que os tratamentos biocontroladores não interferiram significativamente na emergência de plântulas em nenhum dos experimentos conduzidos nesse trabalho. No presente estudo, não havia um tratamento controle negativo para o patógeno (sem XFF), portanto não foi possível mensurar o efeito do patógeno na emergência. Opio, Teri e Allen (1993), em trabalho avaliando a transmissão do agente causal do CBC para as sementes, chegaram a resultados que indicam sementes com alta taxa de infecção apresentaram uma redução na germinação. No presente estudo, as condições para germinação e emergência do feijão se aproximaram do ótimo (umidade e temperatura), diferente do que provavelmente aconteceria em condições de campo, o que poderia reduzir o efeito da redução na germinação proporcionada pelo patógeno. Por outro lado, ao passo que as condições ambientais para germinação do feijão foram favoráveis, também o foram para o patógeno.

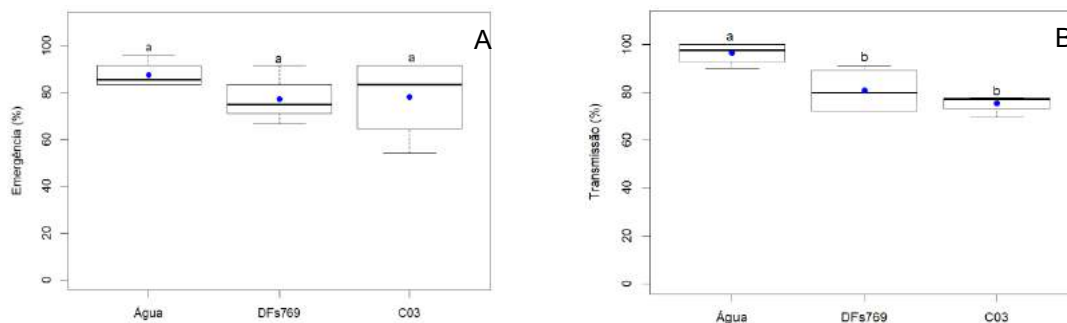


Figura 4 - Emergência de plântulas de feijão (A) e transmissão de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* para plântulas (B), de sementes oriundas de plantas pulverizadas com diferentes tratamentos biocontroladores em época de floração em condições de campo. DFs769 (*Bacillus cereus*), C03 [DFs348 (*Bacillus cereus*) + DFs769 + DFs831 (*P. fluorescens*)], Água (controle negativo). Médias marcadas por pontos em azul, medianas pelo traço na horizontal. Medianas seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher, a 5% de probabilidade. Cultivar de feijão BRS Expedito.

No presente trabalho, foi demonstrado que o tratamento biocontrolador DFs769 foi eficiente em proporcionar uma redução na incidência de sementes transportando o patógeno, na população e na transmissão de XFF de sementes para plântulas, apresentando uma maior estabilidade de resultados, quando em comparação aos demais tratamentos biocontroladores, possuindo assim, potencial para o tratamento de sementes transportando o patógeno. Vários trabalhos tem abordado o efeito do tratamento de sementes com microorganismos benéficos visando o biocontrole, como exemplo, tem-se trabalho de Carvalho e colaboradores (2014), em que os autores comprovaram que o tratamento de sementes de feijão com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseolicum* isolados de *Trichoderma harzianum* foi eficiente em reduzir a transmissão do patógeno nas sementes. Trabalho semelhante, mas utilizando o patossistema *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* x *Capsicum* spp., também comprovou a redução de incidência do patógeno, bem como maior germinação (SHARMA, 2018). Ambos trabalhos corroboraram com os resultados aqui encontrados, em que o controle biológico foi capaz de reduzir significativamente a incidência do patógeno nas sementes.

Sementes de feijão podem transportar XFF internamente e externamente (SCHUSTER; COYNE, 1974; ZAUMEYER; THOMAS, 1957). Quando o patógeno está presente na superfície externa das sementes, o mesmo pode ser mais facilmente afetado pelos biocontroladores, seja por ação de antibiose, seja pela competição por espaço e nutrientes. Segundo Fasolin (2017), os biocontroladores DFs513 e DFs831 (parte da C03), são produtores de sideróforos, sendo assim,



esses isolados são potenciais competidores por ferro. A exemplo da importância da competição por ferro no biocontrole, tem-se trabalho realizado por Halfeld-Vieira *et al.* (2015), em que os autores identificaram que a competição por ferro e por compostos nitrogenados em folhas está relacionada ao controle de *X. axonopodis* pv. *passiflora* e em *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*. A competição por espaço também não pode ser descartada como possível mecanismo de ação dos tratamentos biocontroladores, uma vez que o isolado biocontrolador DFs769, por ser do gênero *Bacillus*, se multiplica mais rápido do que o patógeno. Zhang e Birch (1997), encontraram resultados que indicam que o isolado biocontrolador SB1403 (*Pantoea dispersa*) atua, ao menos em parte, através da competição por espaço, no controle de *X. albilineans*.

Sementes com patógeno localizado internamente também podem ser alvo do biocontrole através da antibiose e competição. Microrganismos biocontroladores endofíticos, podem atuar no biocontrole de doenças através da sua inoculação em sementes, podendo colonizar sistemicamente o hospedeiro, reduzindo a transmissão do patógeno para as plântulas (PAL *et al.*, 2019; VERMA *et al.*, 2018). No presente estudo, não foi avaliada a capacidade dos isolados biocontroladores apresentarem habilidade endofítica, no entanto, não pode-se destacar essa possibilidade.

A estratégia de aplicar biocontroladores em plantas em época de floração, visando à produção de sementes saudáveis é muito interessante, baseando-se no princípio da prevenção, buscando sementes livres do patógeno ou com menor quantidade de inóculo, estratégia essa que poderia ser aplicada em campos de produção de sementes. Embora essa seja uma estratégia já utilizada quando se considera o controle químico (MARZARI *et al.*, 2007; MOHAMMED; AYALEW; DECHASSA, 2013), em se tratando de controle biológico isso não tem sido abordado com frequência, sendo encontrado um único relato, em trabalho que comprovou que a aplicação de biocontroladores realizada nas flores de melancia, reduziu a incidência do patógeno *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* nas sementes produzidas pelas plantas tratadas, bem como a sua transmissão para as plântulas oriundas dessas sementes (FESSEHAIE; WALCOTT, 2005). Os autores sugerem que o mecanismo envolvido na proteção das flores possa ser a competição, ao menos para um dos isolados que apresentou produção de sideróforos. Wilson, Epton e Sigee (1992), em estudo avaliando a interação entre *Erwinia herbicolae* E.

*amylovoraem* estigmas de *Crataegus oxyacantha*, chegaram a conclusão de que o biocontrolador (*E. herbicola*) precisa ser aplicado previamente ao patógeno para ser eficiente, uma vez aplicado previamente, o biocontrolador compete por espaço com o patógeno, reduzindo sua taxa de crescimento nas flores, embora os autores não descartem a possibilidade de ocorrer, complementarmente, efeito da ação de antibióticos produzidos pelo biocontrolador.

No experimento II, a pulverização do biocontrolador foi feita em fase de plena floração do feijão, no entanto, por tratar-se de cultivar de crescimento indeterminado, as plantas não apresentavam a totalidade de suas flores em um mesmo estágio, portanto, havendo flores mais jovens (ainda em botão floral) e mais velhas (em senescência). De maneira semelhante ocorreu no experimento III, em campo, nesse ensaio a primeira pulverização ocorreu em época de plena floração e a segunda em estágio de enchimento de grãos. Portanto, embora as pulverizações com os tratamentos biocontroladores tenham atingido a maior parte das flores das plantas tratadas, devemos considerar que uma parcela significativa das flores não foram pulverizadas. Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos, realizando múltiplas pulverizações durante a floração da cultura, a fim de determinar se pulverizações adicionais resultariam em uma redução ainda maior na transmissão do patógeno.

No presente trabalho, ficou claro que tanto em casa de vegetação (experimento II), em que tem-se um ambiente semi-controlado, como em condições de campo, onde se tem maior efeito da radiação UV, precipitações pluviométricas que podem remover o biocontrolador do filoplano e ação dos ventos (dessecação), o tratamento biocontrolador DFs769 apresentou potencial em reduzir a população, incidência e transmissão do patógeno, quando aplicado em plantas mãe em época de floração. Não foram realizados ensaios que esclarecessem qual o mecanismo de atuação desse biocontrolador e se ele estaria presente nas sementes produzidas, no entanto trabalhos anteriores tem indicado que o isolado DFs769 atua como indutor de resistência ao CBC quando aplicado via foliar (SANGIOGO *et al.*, 2018), apresenta antibiose direta ao isolado XFF28 (SILVA, *et al.*, 2008) e apresenta um rápido crescimento microbiano (característica da espécie), portanto, sugerimos que esse biobontrolador esteja atuando por meio da indução de resistência, antibiose e competição, ocasionando a redução da população do patógeno e sua transmissão.

Em um apanhado geral de todos experimentos conduzidos, percebe-se o potencial do isolado DFs769 no controle do CBC, sendo que o mesmo apresentou

resultados estáveis em todos lotes e réplicas testadas, reduzindo a população do patógeno nas sementes, a incidência de sementes transportando o patógeno, bem como reduzindo a transmissão do patógeno para plantas originadas dessas sementes, tudo isso em diferentes estratégias de controle do CBC, seja no tratamento de sementes naturalmente transportando o patógeno, seja no tratamento das plantas mãe visando a produção de sementes mais sadias.

### **3.4 Conclusões**

- O tratamento de sementes de feijão naturalmente transportando XFF e/ou XAP com o isolado biocontrolador DFs769 reduz a transmissão e população do patógeno nas sementes, bem como a transmissão para as plântulas originárias dessas sementes.
- O tratamento de sementes de feijão naturalmente transportando XFF e/ou XAP com a combinação C03 reduz a transmissão do patógeno.
- A pulverização do biocontrolador DFs769 em plantas de feijão em época de floração reduz a transmissão de XFF para as sementes produzidas, bem como reduz a transmissão do patógeno para plântulas oriundas dessas sementes.
- A pulverização dos tratamentos biocontroladores DFs769 e C03 em plantas de feijão em condições de campo, reduziu a transmissão do patógeno para as sementes produzidas e desta para as plântulas bem como a população do patógeno (DFs769).

#### **4 Considerações finais**

Ostratamentos biocontroladorestestados, DFs513, DFs769 e combinação C03 foram eficientes em reduzir a severidade e incidência inicial do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro, proporcionando os maiores resultados de controle quando aplicados em um intervalo entre aplicação do biocontrolador e inoculação do patógeno inferiores a oito dias. Além disso, o número de pulverizações dos biocontroladores não interferiu no controle do Crestamento bacteriano comum do feijoeiro. Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos em condições de campo, testando intervalos maiores entre aplicação do biocontrolador e inoculação do patógeno, testando novamente o efeito de pulverizações adicionais dos biocontroladores, pois é possível que o curto intervalo de tempo entre aplicações, seja o motivo para ausência de efeito das pulverizações adicionais dos mesmos. Além disso, a condução do experimento em condições de campo vai indicar o período de proteção proporcionado pelos biocontroladores, quando os mesmos forem submetidos a condições de maior radiação UV, precipitações pluviométricas e vento, condições diferentes das encontradas em casa de vegetação e que podem alterar o desempenho dos biocontroladores.

O líquido metabólico dos tratamentos biocontroladorestestados foi capaz de controlar o crestamento bacteriano comum do feijoeiro. Esse é um resultado promissor, abrindo caminho para a possibilidade do uso de produtos produzidos pelos bicontroladores, sem a necessidade de manter a viabilidade das células bacterianas. Estudos complementares deverão ser desenvolvidos, testando o período de proteção proporcionado pelo líquido metabólico dos biocontroladoresem condições de campo, bem como testes de formulação desse produto e sua viabilidade em condições de “prateleira”.

O tratamento de sementes de feijão, naturalmente transportando XFF e/ou XAP com os tratamentos DFs769 e C03, de uma maneira geral, reduziu a transmissão e população do patógeno nas sementes, e sua transmissão para as plântulas originárias dessas sementes. Estudos complementares deverão ser desenvolvidos, com avaliações em experimentos a campo, avaliando a estabilidade desses em condições diferentes daquelas testadas em casa de vegetação e posteriormente, buscando o desenvolvimento de técnicas de formulação desses tratamentos, viabilizando tecnicamente seu uso por produtores de feijão.

A pulverização dos tratamentos biocontroladores DFs769 e C03 em plantas de feijão em condições de casa de vegetação e de campo, reduziram a transmissão do patógeno para as sementes produzidas e destas para as plântulas bem como a população do patógeno (DFs769). Esses resultados abrem a possibilidade de uma nova abordagem no controle biológico do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, em que por meio de pulverizações em época de floração estaria-se protegendo as sementes que se originarão dessas plantas tratadas, buscando assim a produção de sementes saudáveis. Trabalhos futuros deverão ser desenvolvidos para elucidar o mecanismo de biocontrole associado e esclarecendo quanto à necessidade do biocontrolador ser depositado diretamente nas flores ou se o mesmo atua sistemicamente na planta, reduzindo a transmissão do patógeno para as sementes mesmo que o biocontrolador não esteja presente nas flores.

## Referências

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS (ABRASEM). **Anuário 2016**. 2016. Disponível em: < [http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2013/09/Anuario\\_ABRASEM\\_2016\\_SITE.pdf](http://www.abrasem.com.br/wp-content/uploads/2013/09/Anuario_ABRASEM_2016_SITE.pdf)>. Acesso em: 19 jul. 2019.
- AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: < [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 19 jul. 2019.
- AHMADZADEH, M.; TEHRANI, A. S. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. **Biological Control**, v.48, p.101-107, 2009.
- AKRAM, W.; ANJUM, T.; ALI, B. Searching ISR determinant/s from *Bacillus subtilis* IAGS174 against *Fusarium* wilt of tomato. **BioControl**, v. 60, n. 271, p. 1-10, 2015.
- BAKKER, P. A. H. M.; RAN, L. X.; PIETERSE, C. M. J.; VAN LOON, L. C. Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 25, n. 1, p. 5–9, 2003.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4.ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237p.
- BARDAS, G.A.; LAGOPODI, A.L.; KADOGLIDOU, K.; TZAVELLA-KLONARI, K. Biological control of three *Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. **Biological Control**, v. 49, p. 139–145, 2009.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, n. 1, p. 145-172, 1995.
- BEN-SHALOM, N.; AKI, C.; ARDI, R.; PINTO, R. Elicitation effects of chitin oligomers and chitosan sprayed on the leaves of cucumber (*Cucumis sativus*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. **Israel Journal of Plant Sciences**, v. 50, n. 3, p. 199-206, 2002.
- BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 1991. 334 p.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, 2005. p. 333-349.

BORBA, C. M.; FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan enhances seedling emergence and reduces *Fusarium* wilt severity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Protection**, v. 118, p. 66-71, 2019.

BRASIL. Agricultura familiar produz 70% dos alimentos consumidos por brasileiro. Governo do Brasil, Economia e Emprego, 2015. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/07/agricultura-familiar-produz-70-dos-alimentos-consumidos-por-brasileiro>>. Acesso em: 19 jun. 2019.

BRASIL. Manual de análise sanitária de sementes. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2009. Disponível em: <<https://www.abrates.org.br/files/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes.pdf>> . Acesso em: 15/08/2019.

BURKHOLDER, W. H.; BULLARD, E. T. Varietal susceptibility of beans to *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. **Plant Disease Reporter**, v. 30, p. 446-448, 1946.

CAFATI, C. R.; SAETTLER, A. W. Transmission of *Xanthomonas phaseoli* in seed of resistant and susceptible *Phaseolus* genotypes. **Phytopathology**, v. 70, p. 638-640, 1980.

CAMERA, J. N.; KOEFENDER, J.; GOLLE, J. P.; HORN, R.C.; VALÉRIO, I.P.; FLORES, E. F.; DEUNER, C. C. Efficiency of fungicide chemical group in the preventive and curative control of *Puccinia sorghi* in corn and *Cercospora zeae-maydis* sporulation in different culture media. **International Journal for Innovation Education and Research**, v. 6, n. 9, p. 42-54, 2018.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. 1. ed. New York: John Wiley, 1990. 532 p.

CARRER FILHO, R.; DIANESE, E. C.; CUNHA, M. G. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 3, p. 356-363, 2015.

CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 384-391, 2014.

CENTURION, M. A. P. C.; KIMATI, H. Controle biológico da ferrugem do feijoeiro com bactérias antagonistas. **Summa Phytopathologica**, v.20, n.3/4, p.179-183, 1994.

CHUNG, S.; KONG, H.; BUYER, J.S.; LAKSHMAN, D.K.; LYDON, J.; KIM, S.D.; ROBERTS, D.P. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. **Applied Microbial Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 115-123, 2008.

COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number". **Biometrics**, v. 6, p. 105-116, 1950.

COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO – CTSBF. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2. Ed. Florianópolis: EPAGRI, 2012. 157 p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 6- Safra 2018/19 - Oitavo levantamento, Brasília, p. 1-135, maio 2019a.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Análise mensal de maio/junho de 2019: Feijão**. Brasília, p. 1-28, junho 2019b.

CONOVER, W. J. **Practical Nonparametric Statistical**. 3° Ed., New York: John Wiley & Sons Inc., 1999, 584 p.

CORRÊA, B. O. **Microbiolização com bactérias no controle do cretamento bacteriano comum e da antracnose na cultura do feijão**. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

CORRÊA, B. O. **Promoção do crescimento de plantas e controle biológico de doenças em feijão pelo uso de combinações de rizobactérias: mecanismos e ampliação do espectro de ação**. 2010. 99 f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; DENARDIN, N. A.; SOARES, V. N.; SCHÄFER, J. T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p.156-163, 2008.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; GOMES, C. B.; SOMAVILLA, L. ; ROCHA, D. J. A.; ANTUNES, I. F. Potencial da microbiolização de sementes de feijão com rizobactérias para o controle de nematoides das galhas. **Nematropica**, v. 42, p. 341-348, 2012.

CORREA, B. O.; MOURAI, A. B.; DENARDINI, N. A.; SOARES, V. N.; SCHÄFER, J. T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n.2 p.156-163, 2008.

CORRÊA, B.O.; SCHÄFER, J.T.; MOURA, A.B. Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf, root and vascular diseases of dry bean. **Biological Control**, v.72, p.71-75, 2014.

CORRÊA, B. O.; SOARES, V. N.; SANGIOGO, M.; OLIVEIRA, J. R.; MOURA, A. B. Interaction between bacterial biocontrol-agents and strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* effects on biocontrol efficacy of common blight in beans. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 32, p. 1294-1302, 2017.



COSTA, L. B.; MORANDI, M. U. B.; STRICKER, S. M.; BETTIOL, W. UV-B radiation reduces biocontrol ability of *Clonostachys rosea* against *Botrytis cinerea*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 26, n. 12, p. 1736-1749, 2016.

DARRASSE, A.; BUREAU, C.; SAMSON, R.; MORRIS, C.; JACQUES, M. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, p. 203-215, 2007.

DE BOER, S.H.; WARD, L. PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue. **Phytopathology**, v. 85, p. 854-858, 1995.

DE PAIVA, B.A.R.; WENDLAND, A.; BORBA, T.C.; ARAÚJO, L.G. Molecular characterization and differential interaction of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* with common beans (*Phaseolus vulgaris*). **Genetic Molecular Research**, v. 17, n. 1, p. 1-13, 2018.

DELGADO, D. Z.; FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Effectiveness of saccharin and ulvan as resistance inducers against rust and angular leaf spot in bean plants (*Phaseolus vulgaris*). **Crop Protection**, v. 47, p. 67-73, 2013.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995. 434 p.

FASOLIN, J. P. **Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da antracnose e do crestamento bacteriano do feijão por bactérias biocontroladoras**. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

FESSEHAIE, A.; WALCOTT, R.R. Biological control of watermelon seed infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Phytopathology**, v. 95, n. 4, p. 413–419, 2005.

FIGUEREDO, M.S.; TONELLI, M.L.; TAURIAN, T.; ANGELINI, J.; IBAÑEZ, F.; VALETTI, L.; MUÑOZ, V.; ANZUAY, M.S.; LUDUEÑA, L.; FABRA, A. Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. **Journal of Biosciences**, v.39, p.877-885, 2014.

FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Race-specific and ulvan-induced defense responses in 341 bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 8-13, 2012.

FUJITA, S.; YOKOTA, K. Disease suppression by the cyclic lipopeptides iturin A and surfactin from *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of lettuce. **Journal of General Plant Pathology**, v. 85, p. 44-48, 2019.

GARCIA, F. A. O. **Biocaracterização de procariotas como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotores de crescimento em feijoeiro**.

132f. 2008. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

GARCIA, F.A.O.; ROMEIRO, R.S. Biocontrole da mancha-angular do feijoeiro por antagonistas bacterianos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.12, p.1603-1608, 2011.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, L.; ZERIOUH, H.; ROMERO, D.; CUBERO, J.; VICENTE, A.; PÉREZ-GARCÍA, A. The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate- and salicylic acid-dependent defence responses. **Microbial Biotechnology**, v. 6, p. 264–274, 2013.

GARRET, K.A.; SCHWARTZ, H.F. Epiphytic *Pseudomonas syringae* on dry beans treated with copper-based bactericides. **Plant Disease**, v. 82, n. 1, p. 30-35, 1998.

GITAITIS, R.; WALCOTT, R. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. **Annual Review Phytopathology**, v. 45, p. 371-397, 2007.

GOTOR, C.; GARCÍA, I.; AROCA, A.; LAUREANO-MARÍN, A. M.; ARENAS-ALFONSECA, L. ; JURADO-FLORES, A.; MORENO, I.; ROMERO, L. C. Signaling by hydrogen sulfide and cyanide through post-translational modification. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-15, 2019.

GOWTHAM, H. G.; MURALI, M.; SINGH, S.B.; LAKSHMEESHA, T. R.; MURTHY, K. N.; AMRUTHESH, K. N.; NIRANJANA, S. R. Plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens*, improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease. **Biological Control**, v. 126, p. 209-217, 2018.

GUERRA, A.F.; SILVA, D.B.; RODRIGUES, G.C. Manejo de irrigação e fertilização nitrogenada para o feijoeiro na região dos cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.6, p.1229-1236, 2000.

HALFELD-VIEIRA, B. de A.; SILVA, W.L.M. da; SCHURT, D. A.; ISHIDA, A. K. N.; SOUZA, G. R. de; NECHET, K. de L. Understanding the mechanism of biological control of passionfruit bacterial blight promoted by autochthonous phylloplane bacteria. **Biological Control**, v. 80, p. 40-49, 2015.

HENNING, A. A. **Patologia e tratamento de sementes: noções gerais**. Londrina: Embrapa Soja, 2004. 51 p.

HUANG, H. C; BREMER, E.; HYNES, R. K; ERICKSON, R. S. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. **Biological Control**, v. 18, p. 270-276, 2000.

ITO, M.F., VALARINI, P.J., PATRÍCIO, F.R.A.; SUGIMORI, M.H. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* e fungos em sementes de feijão produzidas no estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 118-121, 1997.

JACQUES, M. A.; JOSI, K.; DARRASSE, A.; SAMSON, R. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 2008–2015, 2005.

JAMALIZADEH, M.; ETEBARIAN, H. R.; AMINIAN, H.; ALIZADEH, A. A review of mechanisms of action of biological control organisms against post-harvest fruit spoilage. **EPPO Bulletin**, v. 41, p. 65-71, 2011.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p. 24-30, 1970.

KÄLVÖ, D.; MENKIS, A.; BROBERG, A.; KÄLVÖ, D.; MENKIS, A.; BROBERG, A. Secondary metabolites from the root rot biocontrol fungus *Phlebiopsis gigantea*. **Molecules**, v. 23, n. 6, 2018

KAPADIYA, H.J.; BUTANI, A.M.; KHANPARA, M.D. Biological management of major foliar diseases of cotton. **Journal of Cotton Research and Development**, v. 29, n. 1, p.108-111, 2015.

KARAVINA, C.; MANDUMBU, R.; PARWADA, C.; ZIVENGE, E. Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (E. F. SM). **Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 9, n. 2, p. 1161- 1168, 2011.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **factoextra**: Extract and visualize the results of multivariate data analyses. R package version 1.0.5. 2017. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=factoextra>>. Acesso em: 1 jan. 2019.

KAWAGOE, Y.; SHIRAISHI, S.; KONDO, H.; YAMAMOTO, S.; AOKI, Y.; SUZUKI, S. Cyclic lipopeptide iturin A structure-dependently induces defense response in *Arabidopsis* plants by activating SA and JA signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 460, p. 1015–1020, 2015.

KHABBAZ, S. E.; ZHANG, L.; CÁCERES, L. A.; SUMARAH, M.; WANG, A.; ABBASI, P. A. Characterisation of antagonistic *Bacillus* and *Pseudomonas* strains for biocontrol potential and suppression of damping-off and root rot diseases. **Annals of Applied Biology**, v. 166, p. 456-471, 2015.

LE, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. **Journal of Statistical Software**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2008.

MARDIA, K.V.; KENT, J.T.; BIBBY, J.M. **Multivariate analysis**. London: Academic, 1979. 518 p.

MARTINS, A.; KIMURA, O.; RIBEIRO, R. de L. D.; BALDANI, J. I. Efeito da microbiolização de sementes com rizobactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* sobre a “murcha fusariana” do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) **Agronomia**, v.37, n 1, p. 69-75, 2003

MARTINS, S. J.; DE MEDEIROS, F. H. V.; SOUZA, R. M.; RESENDE, M. L. V.; RIBEIRO JUNIOR, P. M. Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological Control**, v. 66, p. 65-7, 2013.

MARZARI, V.; MARCHEZAN, E.; SILVA, L. S.; VILLA, S. C. C.; SANTOS, F. M.; TELÓ, G. M. População de plantas, dose de nitrogênio e aplicação de fungicida na produção de arroz irrigado qualidade de grãos e sementes. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 936-941, 2007.

MELO, P.A.F.R.; ALVES, E.U.; MARTINS, C.C.; ANJOS NETO, A.P.; PINTO, K.M.S.; ARAÚJO, L.R.; VIEIRA, C.P.; NASCIMENTO, L.C. Extracts of *Caesalpinia ferrea* and *Trichoderma* sp. on the control of *Colletotrichum* sp. transmission in *Sideroxylon obtusifolium* seeds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 494-501, 2016.

MENDIBURU, F. **Agricolae**: Statistical procedures for agricultural research. R package version 1.2-7. 2017. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>>. Acesso em: 1 jan. 2019.

MEZIANE, H.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L. C.; HÖFTE, M.; BAKKER, P. A. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. **Molecular Plant Pathology**, v. 6, n. 2, p. 177-185, 2005.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A.; MUCHOVEJ, J. J.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 540-544, 1995.

MOHAMMED, A.; AYALEW, A.; DECHASSA, N. Effect of integrated management of bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum* Sacc. and Magn.) through soil solarization and fungicide applications on epidemics of the disease and seed health in Hararghe Highlands, Ethiopia. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v. 4, n. 182, p. 1-7, 2013.

MOTA, L; SANTOS, M. A. Chitin and chitosan on *Meloidogyne javanica* management and on chitinase activity in tomato plants. **Tropical Plant Pathology**, v. 2, p. 84–90, 2016.

MOURA, A.B.; CORRÊA, B.O., DENARDIN, N.D. Controle biológico de bactérias fitopatogênicas. **Informe Agropecuário**, v.251, p.7-14, 2009.

NAIK, P.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVE, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2008.

NASCIMENTO, J.M.; GAVASSONI, W. L.; BACCHI, L. M. A.; ZUNTINI, B.; MELO, E. P.; LEONEL, R. K. Número de aplicações e uso de adjuvantes, adicionados a fungicidas no controle da ferrugem asiática da soja. **Agrarian**, v.11, n.40, p. 95-104, 2018.

NASU, É. G. C.; AMORA, D. X.; MONTEIRO, T. S. A.; ALVES, P. S.; PODESTÁ, G. S.; FERREIRA, F. C.; DE FREITAS, L. G. *Pochonia chlamydosporia* applied via seed treatment for nematode control in two soil types. **Crop Protection**, v. 114, p. 106–112, 2018.

NAUE, C. R.; BARBOSA, M. A. G.; BATISTA, D. C.; SOUZA, E. B.; MARIANO, R. L. R. Efeito do tratamento de bacelos de videira “Red Globe” no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 4, p. 853-861, 2014

NAUREEN, Z.; HAFEEZ, F.Y.; HUSSAIN, J.; AL HARRASI, A.; BOUQELLAH, N.; ROBERTS, M.R. Suppression of incidence of *Rhizoctonia solani* in rice by siderophore producing rhizobacterial strains based on competition for iron. **European Scientific Journal**, v. 11, n. 3, p. 186-207, 2015.

OPIO, A. F.; TERI, J. M.; ALLEN, D. J. Studies on seed transmission of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in common beans in Uganda. **African Crop Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 59-67, 1993.

PAL, G.; KUMAR, K.; VERMA, A.; WHITE J. F.; VERMA, S. K. Functional roles of seed-inhabiting endophytes of rice. In: VERMA S.; WHITE, JR J. (eds) **Seed Endophytes**. Cham: Springer, 2019. 497 p.

PATEL, S.; SAYYED, R. Z.; SARAF, M. Bacterial determinants and plant defense induction: their role as biocontrol agents in sustainable agriculture. In: HAKEEM K., AKHTAR M. (eds) **Plant, soil and microbes**. Cham: Springer. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-29573-2\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-29573-2_9)>. Acesso em 20/08/2019.

PIETERSE, C. M. J.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; VAN WEES, S. C. M.; BAKKER, P. A. H. M. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review Phytopathology**, v.52, p.347–375, 2014.

PLANCHAMP, C.; GLAUSER, G.; MAUCH-MANI, B. Root inoculation with *Pseudomonas putida* KT2440 induces transcriptional and metabolic changes and systemic resistance in maize plants. **Frontiers in Plant Science**, v.5, art.719, 2015.

PONTES, N. C.; NASCIMENTO, A. R.; GOLYNSKI, A.; MAFFIA, L. A.; ROGÉRIO DE OLIVEIRA, J.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Intervals and number of applications of Acibenzolar-S-Methyl for the control of bacterial spot on processing tomato. **Plant Disease**, v. 100, n. 10, p. 2126–2133, 2016.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computin, 2018.

RANASINGHE, L.; JAYAWARDENA, B.; ABEYWICKRAMA, K. Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M. Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, n. 3, p. 208-211, 2002.

RAVA, C. A. Patogenicidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, n. 4, p.445-448, 1984.

RAVA, A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: SARTORATO, A.; RAVA, A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 217-231.

REISS, A.; JØRGENSEN, L. N. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade® ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713). **Crop Protection**, v. 93, p. 1–8, 2017.

RODRÍGUEZ, J.; TONELLI, M. L.; FIGUEREDO, M. S.; IBÁÑEZ, F.; FABRA, A. The lipopeptide surfactin triggers induced systemic resistance and priming state responses in *Arachis hypogaea* L. **European Journal of Plant Pathology**, v. 152, n. 3, p. 845–851, 2018.

REDE OFICIAL DE LABORATÓRIOS DE ANÁLISE DE SOLO E DE TECIDO VEGETAL (ROLAS). **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2004. 400p.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 279p.

RUDOLPH, K. Infection of the Plant by *Xanthomonas*. In SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E.L., Eds., **Xanthomonas**. London: Chapman and Hall, 193-264, 1993.

SAETTLER A.W. Common bacterial blight. In: HALL, R, ed. **Compendium of bean diseases**. St. Paul, USA: APS Press, 1991. p. 29-30.

SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W; ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed and other planting material**. St. Paul: The American Phytopathological Society Press, 1989. 122 p.

SANGIOGO, M.; RODRIGUEZ, D. P.; MOCCELLIN, R.; BERMUDEZ, J. M. M.; CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B. Foliar spraying with bacterial biocontrol agents for the control of common bacterial blight of bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.53, n.10, p.1101-1108, 2018.

SANTOS, A. S. **Biocontrole de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e promoção do crescimento de plantas de feijão pela microbiolização de sementes com bactérias**. 2006. 41 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

SARTORATO, A.; RAVA, C.A.; RIOS, G.P. Doenças fúngicas e bacterianas da parte aérea. In: ARAÚJO, S.A.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Ed.). **A cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para a Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1996. p.669-722.

SARWAR, A.; HASSAN, M. N.; IMRAN, M.; IQBAL, M.; MAJEED, S.; BRADER, G.; SESSITSCH, A.; HAFEEZ, F. Y. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. **Microbiology Research**, v. 209, p. 1-13, 2018.

SCHAAD, N. W. Detection of seedborne bacterial plant pathogens. **Plant Disease**, v. 66, p. 885-890, 1982.

SCHUSTER, M. L.; COYNE, D. P. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v. 12, p. 199-221, 1974.

SCHUSTER, M. L.; SAYRE, R. M. A coryneform bacterium induces purple-colored seed and leaf hypertrophy of *Phaseolus vulgaris* and other leguminosae. **Phytopathology**, v. 57, p. 1064-6, 1967.

SHARMA, D. K. Bio-efficacy of fungal and bacterial antagonists against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in chilli (*Capsicum* spp.) grown in Rajasthan. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n.2, p. 207-213, 2018.

SHINDE, S.J.; PRASHANTHI, S.K.; KRISHNARAJ, P.U. Identification and utilization of actinobacteria for biocontrol of rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. **Asian Journal of Bio Science**, v. 9, p.227-233, 2014.

SILVA, E. G.; MOURA, A. B. ; DEUNER, C. C.; FARIAS, D. R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v. 55, p. 377-383, 2008.

SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; BACARIN, M. A.; DEUNER, C. C. Alterações metabólicas em plantas de feijão originadas de sementes microbiolizadas por *Pseudomonas* sp. e inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p. 98-104, 2009.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia brasileira**, v. 32, n. 3, p.189-196, 2007.

SINGH, S.P.; P.N. MIKLAS. Breeding common bean for resistance to common blight: a review. **Crop Science**, v. 55, p. 971–984, 2015.

SLININGER, P. J.; SHEA-WILBUR, M. A. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 5, p. 794–800, 1995.

SPAGO, F.R.; ISHII MAURO, C.S.; OLIVEIRA, A.G.; BERANGER, J.P.O.; CELY, M.V.T.; STANGANELLI, M.M.; SIMIONATO, A.S.; SAN MARTIN, J.A.B.; ANDRADE, C.G.T.J.; MELLO, J.C.P.; ANDRADE, G. *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. **Crop Protection**, v.62, p.46-54, 2014.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

SWAROOP, S. The range of variation of the most probable number of organisms estimated by the dilution method. **Indian Journal Medical Research**, v. 39, n. 1, p. 107-134, 1951.

SWINGS, J. G.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E. L. **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 121-146.

TORRES, J. P.; MARINGONI, A. C.; SILVA, T. A. F. Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in common bean leaflets on soil. **Journal of Plant Pathology**, v. 91, n. 1, p. 195–198, 2009.

TORRES, J. P.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; MARINGONI, A.C. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean seeds from the state of Paraná (Brazil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 136-139, 2009.

VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: métodos para detecção em sementes de feijão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 373-383, 1992.

VALARINI, P. J.; SPADOTTO, C. A. Identificação de nichos de sobrevivência de fitopatógenos em áreas irrigadas de Guaíra, SP. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30 n. 10, p. 1239-43, 1995.

VALE, F.X.R.; COSTA, H.; ZAMBOLIM, L. Feijão comum: doenças da parte aérea causada por fungos. In: VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, v.1, 1997. p. 341-350.

VAN LOON, L. C. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, p. 753-765, 1997.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P.; VAN DER, H. W.; WENDEHENNE, D.; PUGIN, A. Early responses of tobacco suspension cells to rhizobacterial elicitors of induced systemic resistance. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, p. 1609–1621, 2008.

VERMA, S. K.; KINGSLEY, K.; BERGEN, M.; ENGLISH, C.; ELMORE, M. KHARWAR, R. N.; WHITE, J. F. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1, p. 223–238, 2018.

VIEIRA-JUNIOR, J.R. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. 2005. 140f.



Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VIGO, S. C.; MARINGONI, A. C.; CAMARA, R. C.; LIMA, G. Evaluation of pyraclostrobin and acibenzolar-S-methyl on common bacterial blight of snap bean. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 167-174, 2012.

WALKER, A. **openxlsx**: Read, write and edit xlsx files. R package version 4.1.0. 2018. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=openxlsx>>. Acesso em: 1 jan. 2019.

WALLEN, V.R., GALWAY, D.A. Effective management of bacterial blight of field beans in Ontario, a 10 yeais programe. **Canadian Journal Plant Pathology**, v. 1, p. 42-46, 1979.

WALLEN, Y. R.; SUTTON, D. M. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. on field beans in Ontario. **Canadian Journal of Botany**, v. 43, p. 437-446, 1965.

WEI, T.; SIMKO, V. **R package "corrplot"**: visualization of a correlation matrix (version 0.84). 2017. Disponível em: <<https://github.com/taiyun/corrplot>>. Acesso em: 1 jan. 2019.

WELLER, D. M.; SAETTLER, A. W. Colonization and distribution of *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* in field-grown navy beans. **Phytopathology**, v. 70, p. 500-506, 1980.

WENDLAND, A.; DA SILVA, L. L.; MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; DA COSTA, J. G. C.; DEL PELOSO, M. J.; DE BRITO FERREIRA, E. P. Productivity losses among different common bean genotypes caused by common bacterial blight. **Annual report of the bean improvement cooperative**, v. 53, p. 216-217, 2010.

WILSON, M; EPTON, H. A. S.; SIGEE, D. C. Interactions between *Erwinia herbicola* and *E. amylovora* on the stigma of hawthorn blossoms. **Phytopathology**, v. 82, p. 914–918, 1992.

YONGGANG, L.; RUITING, W.; JINXIN, L.; LANKUN, X.; PINGSHENG, J.; LEI, S.; HONGYU, P.; BAIWEN, J.; LINGRONG, L. Identification of a biocontrol agent *Bacillus vallismortis* BV23 and assessment of effects of its metabolites on *Fusarium graminearum* causing corn stalk rot. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 263-275, 2019.

YOSHII, K.; GALVEZ, G. E. ; TEMPLE, S. R.; OROZCO, S. H.; MASAYA, P.; ALDANA, L. F. Release of three new Guatemalan bean varieties tolerant to *Golden Mosaic Virus*. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 23, p. 122-124, 1980.

ZANATTA, Z.G.C.N. **Potencial de bactérias para biocontrole de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli***. 2004. 67f. Tese (Doutorado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

ZANATTA, Z.G.C.N.; MOURA, A.B.; MAIA, L.C.; SANTOS, A.S. Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) . **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 511-515, 2007.

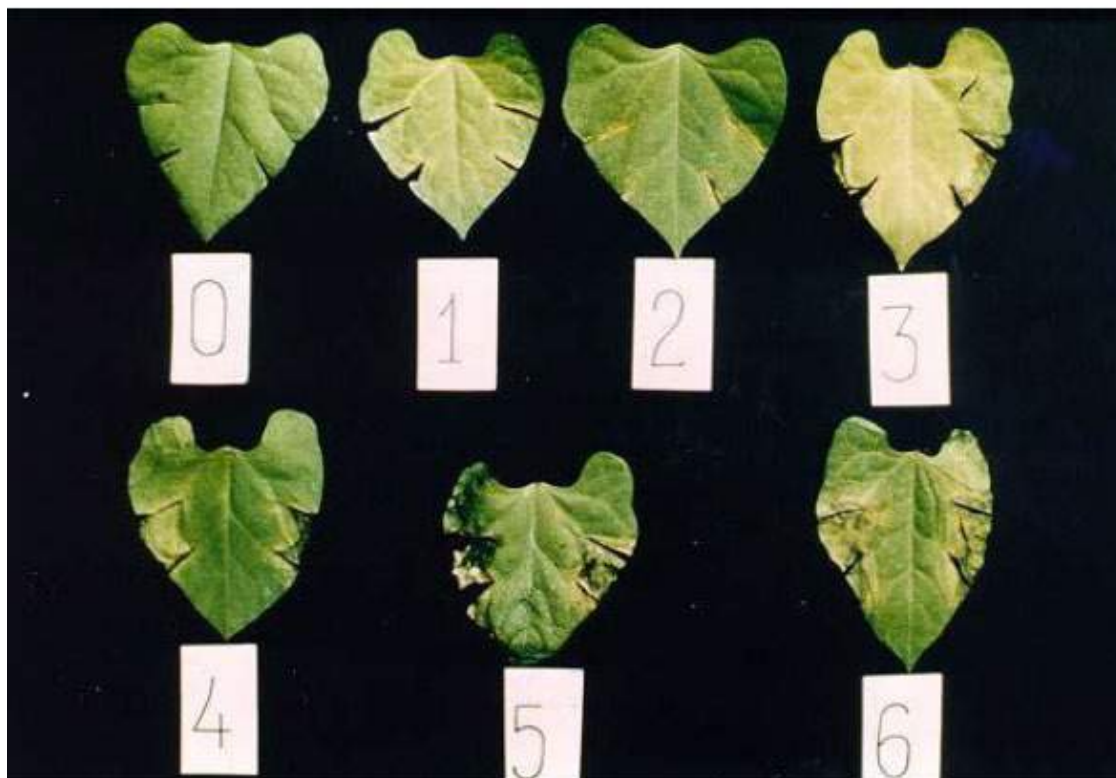
ZAUMEYER, W. J.; THOMAS, H. R. **Bean diseases:** how to control them. Washington: United States Department of Agriculture, 1957.

ZHANG, L.; BIRCH, R. G. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 448-454, 1997.

ZOHORA, U.S.; ANO, T.; RAHMAN, M.S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 424-431, 2016.

## **Anexos**

Anexo A - Escala de notas para severidade dos sintomas de crestamento bacteriano comum causado por *Xanthomonas axonopodis* sp. *phaseoli* em folhas de feijão.



Fonte: RAVA (1984).

Anexo B - Interpretação de resultados para quantificar XAP em amostras de sementes de feijão.

Número de subamostras com resultados positivos		N° + provável (NMP) de sementes portadoras do patógeno (%)	Limites do NMP/100 sementes	
100s	10s		Inferior	Superior
1	0	0,2	< 0,1	0,9
1	1	0,4	0,1	13
2	0	0,5	0,1	1,4
2	1	0,7	0,2	1,9
2	2	0,9	0,3	2,3
3	0	0,8	0,2	2,2
3	1	1,1	0,3	2,7
3	2	1,4	0,5	32
3	3	1,8	0,7	3,8
4	0	1,3	0,4	3,4
4	1	1,7	0,6	4,2
4	2	2,2	0,8	52
4	3	2,8	1,1	6,3
4	4	3,5	1,4	7,6
5	0	2,4	0,7	7,3
5	1	3,5	1,1	10,9
5	2	5,4	1,6	16,6
5	3	9,2	2,6	25,6
5	4	16,1	4,6	44,6

(<) menor de que; (>) maior de que

Fonte: Valarini, 1990, adaptada de Swaroop. 1951.