

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS E NO CONTROLE DA ANTRACNOSE E DO
CRESTAMENTO BACTERIANO DO FEIJÃO
POR BACTÉRIAS BIOCONTROLADORAS**

Julia Pelegrineli Fasolin

Pelotas, 2017

Julia Pelegrineli Fasolin

**INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS
ANTIMICROBIANOS E NO CONTROLE DA ANTRACNOSE E DO
CRESTAMENTO BACTERIANO DO FEIJÃO POR BACTÉRIAS
BIOCONTROLADORAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fitossanidade (área de conhecimento: Fitopatologia).

Orientadora: Dr^a. Andrea Bittercourt Moura
Co-orientador: Dr. William Mario de C. Nunes
Co-orientadora: Dr^a. Renata Moccellini

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

F248i Fasolin, Julia Pelegrineli

Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da antracnose e do crestamento bacteriano do feijão por bactérias biocontroladoras. / Julia Pelegrineli Fasolin ; Andrea Bittercourt Moura, orientadora ; Wiiliam Mario de C. Nunes, Renata Moccellin, coorientadores. — Pelotas, 2017.

66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Controle biológico. 2. Phaseolus vulgaris. 3. Pulverização foliar. 4. Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli. 5. Colletotrichum lindemuthianum. I. Moura, Andrea Bittercourt, orient. II. Nunes, Wiiliam Mario de C., coorient. III. Moccellin, Renata, coorient. IV. Título.

CDD : 635.652

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Andrea Bittencourt Moura
(Orientadora)

Dr. César Bauer Gomes

Dr. Glaucia de F. Nachtigal

Dr. Ismail Teodoro de Souza Júnior

Aos meus pais Genesio Fasolin e Aparecida de Fátima Pelegrineli Fasolin.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, saúde, força e tudo que tem me proporcionado até o presente momento.

Aos meus pais, Genesio Fasolin e Aparecida de Fátima Pelegrineli, e meus irmãos Pedro e Tiago, por todo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu namorado Rafael Becker pelo ânimo, carinho e compreensão concedidos.

A Prof^a Dr^a. Andréa Bittencourt Moura, pela orientação durante esses dois anos, pelo suporte, correções, incentivo, confiança e paciência.

A Dr^a Renata Moccasin, pela co-orientação, amizade, caronas, conselhos e por todos os desafios que se dispôs a enfrentar junto a mim durante a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. William Mario de Carvalho Nunes, pelo estímulo para que desse início a esta jornada, pela co-orientação e atenção.

Ao Dr. Irajá Ferreira Antunes (Embrapa-CPACT) pela disponibilização das sementes, ao Professor Dr. Marcos Baccarin pela casa de vegetação e a Dr^a Cândida R. Jacobsen pela sala de incubação para a realização dos experimentos.

Aos laboratoristas, Sérgio Freitas e Rosária Helena Azambuja, sempre dispostos a ajudar e solucionar problemas.

Ao mestre Mauricio Sangiogo pela troca de experiências e auxílio nas análises estatísticas.

Aos amigos e colegas da Universidade: Ismail T. Sousa Júnior; Bruna Rohrig, Giovana Santin, Daniele Brumm, Johan Bermudez, Priscila Meneses, Wellington Rodrigues, Victoria Moreira, Viviana Gaviria, Keilor Dorneles, Vanessa Gonçalves, Carolina Neves, Monique e Silvia que fazem com que a universidade se torne um ambiente mais familiar.

Aos professores do programa de Pós Graduação em fitossanidade, a Universidade Federal de Pelotas e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de realização do curso.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FASOLIN, Julia Pelegrineli. **Influência da temperatura na produção de compostos antimicrobianos e no controle da antracnose e do crestamento bacteriano do feijão por bactérias biocontroladoras**

2017. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

O controle biológico é uma ferramenta fundamental para minimizar os danos causados pelo uso excessivo de agrotóxicos. Entretanto, para garantir resultados consistentes é necessário que os microrganismos utilizados apresentem a maior estabilidade possível, mesmo sob condições adversas. Sabendo que a temperatura pode influenciar a sobrevivência e as atividades dos microrganismos, o objetivo deste estudo foi avaliar por meio de estudos *in vitro* a capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole, bem como verificar o biocontrole *in vivo* por bactérias pré-selecionadas como biocontroladoras de doenças da cultura do feijão, sob diferentes condições de temperatura. Para tal, oito isolados bacterianos DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*P. fluorescens*; DFs842-*P. fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp., foram avaliados em ensaios *in vitro*, avaliando o crescimento, a motilidade do tipo *swarming*, a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas (quitinase, caseinase e lecitinase), de sideróforos e de amônia, sob cinco temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C), assim como a antibiose contra *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de compostos voláteis ou não, sob três condições de temperatura (17, 22 e 27°C); e *in vivo*, em folhas destacadas de feijão, pulverizadas preventivamente com os biocontroladores e incubadas durante 48h em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C), para o biocontrole da antracnose e do crestamento bacteriano comum. Verificou-se que a capacidade e velocidade de produção dos compostos relacionados ao biocontrole podem ser influenciadas pela temperatura de incubação. As bactérias estudadas possuem potencial *in vitro* de controle de *C. lindemuthianum* por meio da produção de compostos antimicrobianos voláteis ou não em diferentes temperaturas. A pulverização de folhas de feijão com os isolados DFs093, DFs348, DFs513, DFs769, DFs831 e DFs842 reduziram a severidade da antracnose. Os mesmos isolados, além de DFs843 e DFs912, reduziram a severidade do crestamento bacteriano comum. Independentemente dos tratamentos, a incubação das folhas de feijão em diferentes temperaturas precedente à inoculação do patógeno interfere nos níveis de doença da antracnose e do crestamento bacteriano comum, sendo a temperatura de 37°C a que proporcionou as maiores médias dessas variáveis para as duas doenças estudadas, entretanto, os tratamentos bacterianos mantiveram seus níveis de biocontrole em todas as temperaturas estudadas.

Palavras-chave: Controle biológico, *Phaseolus vulgaris*, pulverização foliar, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum*.

ABSTRACT

FASOLIN, Julia Pelegrineli. **Influence of temperature on the production of antimicrobial compounds and the control of anthracnose and bacterial blight of the bean by biocontrol bacterias**

2017. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Biological control is a fundamental tool to minimize the damages caused by the excessive use of pesticides. However, to ensure consistent results it is necessary that the microorganisms used have the highest possible stability, even under adverse conditions. Knowing that temperature can influence the survival and the activities of microorganisms, the objective of this study was to evaluate *in vitro* the capacity of production of compounds related to the biocontrol, as well as to verify the biocontrol *in vivo* by bacteria preselected as biocontroller of common bean diseases, under different temperatures. For this, eight bacterial isolates DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*P. fluorescens*; DFs842-*P. fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp., were studied in *in vitro* assays, evaluating growth, swarming motility, the capacity to produce hydrolytic enzymes (chitinase, caseinase and lecithinase), siderophores and ammonia, under five temperatures (17, 22, 27, 32 e 37°C); as well as the antibiosis against *Colletotrichum lindemuthianum* by volatile or not compounds, under three temperature conditions (17, 22 e 27°C); and *in vivo*, in common bean detached leaves, sprayed preventively with the biocontroller and incubated for 48h at different temperatures (17, 22, 27, 32 e 37°C), for the biocontrol of anthracnose and bacterial common blight. It has been found that the capacity and speed of production of the compounds related to the biocontrol can be influenced by the incubation temperature. The bacteria studied have *in vitro* potential to control *C. lindemuthianum* through the production of antimicrobial compounds, volatile or not, at different temperatures. The spraying of bean leaves with the isolates DFs093, DFs348, DFs513, DFs769, DFs831 e DFs842 reduced the severity of anthracnose. The same isolates, and also DFs843 and DFs912, reduced the severity of bacterial common blight. Regardless of the treatments, the incubation of the bean leaves at different temperatures before the inoculation of the pathogen interferes in the incidence and severity levels of anthracnose and bacterial common blight, being the temperature of 37°C which provided the highest averages of these variables for the two diseases studied, however, bacterial treatments maintained their biocontrol levels at all temperatures studied.

Key words: Biological control, *Phaseolus vulgaris*, leaf spraying, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Colletotrichum lindemuthianum*.

Lista de Figuras

Figura 1 - Curva de crescimento dos isolados biocontroladores medido por meio da absorbância (A_{540}) após 6, 12, 24, 36 e 48 horas de incubação em meio caldo nutriente sob agitação contínua (100 rpm) em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.* .30

Figura 2- Motilidade do tipo *swarming* dos isolados biocontroladores após 24 horas de incubação em meio LB (0,6%) sob diferentes temperaturas. DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*31

Figura 3 - Produção de caseinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de cultura Leite-Ágar. DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*33

Figura 4 - Produção de lecitinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de lecitina (4%). DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*34

Figura 5 - Produção de sideróforos de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio King concentrado acrescido de corante CAS. DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*35

Figura 6 - (A) Porcentagem de redução do crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* pelos isolados biocontroladores por meio de compostos voláteis após 20 dias de incubação em placas de Petri divididas contendo ágar nutriente sob diferentes temperaturas. *Médias diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.* (B) Crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* em função de diferentes temperaturas de incubação em placas divididas contendo ágar nutriente. ^{ns}Médias não diferem estatisticamente entre si.....37

Figura 7 - (A) Porcentagem de redução do crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* pelos isolados biocontroladores por meio de confronto pareado em placas de Petri divididas contendo ágar nutriente após 20 dias de incubação sob diferentes temperaturas. *Médias diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.* (B) Crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* em função de diferentes temperaturas de incubação em meio ágar nutriente. ^{ns}Médias não diferem estatisticamente entre si.....38

Figura 8 - Severidade acumulada da antracnose representada pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas destacadas de feijão pulverizadas com biocontroladores e submetidas a diferentes temperaturas por 48 horas. Avaliações realizadas ao 5º, 7º, 9º, 11º e 13º dia após a inoculação. Após inoculação as folhas foram incubadas a 22°C. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*.....39

Figura 9 - Severidade acumulada do crescimento bacteriano comum representada pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas destacadas de feijão pulverizadas com biocontroladores e submetidas a diferentes temperaturas por 48 horas. Avaliações realizadas ao 3º, 5º, 7º, 9º e 11º dia após a inoculação. Após inoculação as folhas foram incubadas a 27°C. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*.....40

Lista de tabelas

Tabela 1 – Crescimento qualitativo dos isolados biocontroladores cultivadas em meio ágar nutriente por 72 horas em diferentes temperaturas de incubação	28
Tabela 2 - Capacidade de produção de quitina dos isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação após 28 dias em meio de quitina (0,5%)	32
Tabela 3 - Quantidade de horas necessárias para a detecção da produção de amônia dos isolados biocontroladores incubados sob agitação orbital (100rpm) em diferentes temperaturas.....	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 A cultura do feijão	15
2.2 Antracnose.....	16
2.3 Crestamento bacteriano comum	17
2.4 Controle biológico de fitopatógenos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Isolados bacterianos e condições de cultivo	21
3.2 Avaliação qualitativa do crescimento em função da temperatura	22
3.3 Avaliação quantitativa do crescimento em função da temperatura.....	22
3.4 Avaliação da motilidade em diferentes temperaturas	22
3.5 Avaliação da produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitopatógenos em função da temperatura	23
3.6 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas	23
3.7 Produção de compostos antimicrobianos	24
3.8 Antibiose <i>in vitro</i>	25
3.9 Biocontrole <i>in vivo</i> (folhas destacadas de feijão)	26
3.10 Procedimentos Estatísticos	27
4. RESULTADOS.....	28
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	51
7. REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO GERAL

Há mais de 15 anos de estudo o grupo de pesquisa “Controle Biológico de Doenças de Plantas e Promoção de Crescimento Vegetal” da Universidade Federal de Pelotas, selecionou bactérias biocontroladoras eficientes quando utilizadas individualmente ou em combinação para microbiolizar sementes de feijão, controlando doenças como o crestamento bacteriano comum (ZANATTA, 2004; SILVA et al., 2008; SANTOS, 2006; CORRÊA, 2007), mancha angular, antracnose, podridão cinzenta, murcha de curtobactério, murcha de fusário (CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014) e nematoide das galhas (CORRÊA et al., 2012), por meio de diferentes mecanismos de ação, como antibiose (ZANATTA, 2004; CORRÊA, 2007; CORRÊA et al., 2008; CORRÊA, 2010), competição (CORRÊA, 2010) e indução de resistência (SILVA et al., 2009). Recentemente, foram realizados ensaios mostrando o potencial de uso dessas bactérias tanto isoladas quanto combinadas para pulverização foliar, visando o controle do crestamento bacteriano comum (CBC) e da antracnose (ANACKER, 2013; SANGIOGO, 2015; BERMÚDEZ, 2016).

Dentre as doenças fúngicas que atacam a cultura do feijão, a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) (BIANCHINI et al., 1997) (CL) está entre as principais, podendo ocasionar perdas de até 100% da produção dependendo das condições ambientais e fatores ligados à cultivar utilizada (CHIORATO et al., 2015). Além disso, fatores relacionados ao patógeno como: elevada capacidade de sobrevivência e, principalmente, ampla variabilidade patogênica dificultam o controle da doença (DILLARD; COBB, 1993). Já entre as doenças bacterianas do feijoeiro, a principal delas no Brasil é causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) (SILVA et al., 2013) (XAP). A doença

tem disseminação mundial e pode causar prejuízos severos, com perdas que podem variar de 10 a 70% no peso de grãos (TOILLER et al., 2010). A importância da doença tem sido descrita devido à dificuldade de controle, pois no caso de bacterioses o controle químico, tanto para tratamento de sementes quanto por meio de pulverizações foliares é economicamente inviável e ineficiente na maioria dos casos (MOURA; CORRÊA; DENARDIN, 2009).

Para o controle da antracnose do feijão apenas um produto biológico é registrado para a cultura, sendo este a base de *Bacillus pumilus*. Já para o controle da *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, até o momento não existem produtos biológicos registrados no país, sendo que os produtos comerciais registrados são a base de (acibenzolar-S-metílico [benzotiadiazol]), hidróxido de cobre e óxido cuproso (AGROFIT, 2017).

Nesses casos, o controle biológico é uma estratégia interessante para o controle da doença, pois se torna uma alternativa em substituição aos fungicidas e bactericidas para reduzir os danos causados por doenças (WU et al., 2014; KHEM; SAMSHER 2015). O principal modo de ação da maioria dos produtos biológicos é o antagonismo mediado por moléculas antimicrobianas secretadas pelo biocontrolador (CHOWDHURY et al., 2015, MORA; CABREFIGA; MONTESINOS, 2015). No entanto, outros processos biológicos são importantes, como por exemplo o parasitismo (HOWELL, 2003), onde é necessário a produção de enzimas líticas; a competição espacial e nutritiva (BRZEZINSKA et al., 2014; NAUREEN, 2015), a produção de compostos voláteis (RAZA et al., 2016), e a formação de biofilme do biocontrolador (DE LA FUENTE et al., 2013; TRIVENI et al., 2015) .

No entanto, o uso do controle biológico é dependente da efetividade dos agentes biocontroladores e da disponibilidade de produtos comerciais contendo estes microrganismos. Algumas limitações inerentes no uso de organismos vivos, como tempo de prateleira, desempenho inconsistente no campo (NEERAJA et al., 2010) e resultados variáveis em experimentos com antagonistas (ROCHA; MOURA, 2013) constituem os principais fatores que limitam a expansão do controle biológico. Como possíveis fontes dessa variação de resultados do biocontrolador têm sido propostos problemas relacionados à homogeneidade das condições, como o clima, temperatura, substrato utilizado, umidade e pH do solo (BABALOLA, 2010; BACH et al., 2016).

Sabe-se que mudanças no clima afetam o desenvolvimento das doenças (BRADLEY et al. 2012; MATYSSEK et al. 2012), bem como podem influenciar o desenvolvimento dos microrganismos e as interações entre eles (CHAKRABORTY, 2001; HANKE et al., 2015). No que diz respeito a mudanças da temperatura, os microrganismos também são fortemente influenciados, uma vez que todos os processos de crescimento são dependentes de reações químicas, que, por sua vez, são afetadas pela temperatura (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996), por exemplo, para algumas bactérias, exsudatos podem ser mais rápida ou lentamente liberados a uma temperatura superior ou inferior, respectivamente (KATO; WATANABE; ARIMA, 2005; NIHORIMBERE et al., 2009).

Assim, os agentes de biocontrole podem ser fortemente influenciados por mudanças de temperatura, e a eficácia do biocontrole pode ser dependente dessa variável ambiental (ASHRAFUZZAMAN et al., 2009). Para minimizar tais problemas e dar maior sustentação ao controle biológico, antagonistas candidatos devem ser testados em ensaios sob várias condições ambiente, como por exemplo, variação de temperatura, permitindo desta forma, conhecer os aspectos positivos e negativos dos candidatos e determinar sua aptidão (KÖHL et al., 2011).

Embora se saiba que o ambiente pode influenciar o desenvolvimento e a suscetibilidade da planta hospedeira, a multiplicação, a sobrevivência e as atividades dos microrganismos, assim como a interação entre a planta hospedeira e estes microrganismos, a literatura ainda dispõe de poucas informações sobre os efeitos das variações climáticas em relação ao controle biológico de doenças de plantas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar por meio de experimentos *in vitro* a capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole, bem como avaliar o biocontrole *in vivo* por bactérias pré-selecionadas como biocontroladoras de doenças da cultura do feijão, sob diferentes temperaturas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do feijão

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais importante do mundo (POPOVIC et al., 2012; BROUGHTON et al., 2003). Assim como em outros países, no Brasil é a principal fonte protéica e com maior acessibilidade social à população (CARVALHO et al., 2014). Possui também elevada importância econômico-social, a qual está relacionada à geração de empregos e à absorção de mão de obra agrícola, principalmente em regiões onde há predominância do cultivo com produção familiar (ELIAS et al., 2007). A faixa de temperatura ideal para o desenvolvimento do feijão situa-se entre 15 e 29°C, sendo a temperatura média ideal de 21°C (SHONNARD; GEPTS, 1994). No Brasil, as condições edafoclimáticas permitem o cultivo da leguminosa durante todo o ano, em quase todos os estados brasileiros (ELIAS et al., 2007; BARBOSA; GONZAGA, 2012).

Segundo a CONAB (2017), na safra 2016/17, a produção total do país está estimada em 3.390,8 mil toneladas em uma área de 3.069 mil hectares. Porém, apesar do grande volume produzido no país, a média de rendimento da cultura é considerada insatisfatória em relação ao potencial produtivo (GUERRA; SILVA; RODRIGUES, 2000). Entre os principais fatores que contribuem para a baixa produtividade do feijoeiro está a alta sensibilidade a eventos climáticos, manejo cultural inadequado, competição com ervas daninhas e a ocorrência de pragas e doenças (ZUCARELI et al., 2011; RODRÍGUEZ DE LUQUE; CREAMER, 2014).

Entre as doenças de maior importância que acometem a cultura, destacam-se a antracnose (CHIORATO et al., 2015), o CBC (SARTORATO; RAVA; RIOS 1996), a podridão de raiz e do colo (BLUM et al., 2003), mofo branco (BOECHAT et al.,

2014), a mancha angular (GARCIA; ROMEIRO, 2011) e o mosaico dourado do feijoeiro (KIMATI et al., 2005).

2.2 Antracnose

Dentre as doenças fúngicas que afetam a cultura do feijão, a antracnose está entre as principais (DI PIERO; GARDA, 2008; CHIORATO et al., 2015), sendo ocasionada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. e Mag.) Scrib. (BIANCHINI et al., 1997). No Brasil, a presença do fungo é constante nos mais diferentes plantios durante o todo o ano (DALLA PRIA; AMORIN; FILHO, 2003; GARCIA et al. 2007). A doença afeta expressivamente a produtividade, podendo provocar prejuízos de até 100%, principalmente quando associados à cultivares suscetíveis e locais onde há condições favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (SINGH; SCHWARTZ, 2010; SILVA et al., 2013).

O fungo, *C. lindemuthianum* (fase assexuada) pertence a classe dos Deuteromicetos, sendo caracterizado como hemibiotrófico, produz conídios hialinos e unicelulares. A fase perfeita (sexuada) pertence a classe dos Ascomicetos, sendo chamada então de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (KIMATI et al., 2005). Este patógeno apresenta grande variabilidade patogênica, com aproximadamente 114 raças identificadas no mundo (FERREIRA; CAMPA; GIRALDEZ, 2008; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2008), sendo mais de 50 identificadas no Brasil (SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007). Os sintomas da doença podem ocorrer em toda parte aérea da planta, (PARRELLA; SANTOS; PARRELLA, 2008), sendo que nas folhas os sintomas são visualizados inicialmente na face abaxial, onde são observadas necroses nas nervuras, que posteriormente tornam-se manchas cloróticas que promovem o see ressecamento (KIMATI, 2005). No caule e nos pecíolos as lesões possuem coloração marrom escuro ou parda; nas vagens, as lesões são arredondadas, deprimidas, de tamanho variável e com o centro claro, sendo delimitadas por um anel negro, saliente, com borda marrom-avermelhada (HALL, 1991). Quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis, uma massa de conídios de coloração rosada é formada no centro das lesões (DALLA PRIA et al., 1999).

A umidade relativa do ar possui correlação positiva com a severidade da doença. Já as altas temperaturas e a pouca pluviosidade tendem a desfavorecer o fungo. Temperaturas elevadas acima de 33°C podem inibir a infecção (GARCIA et al., 2007). De acordo com Bianchini, Maringoni e Carneiro (1997), o desenvolvimento da doença é favorecido por temperaturas entre 13 a 27°C, com o ótimo a 21°C, e umidade relativa acima de 91%.

A estratégia de controle para a antracnose é a utilização de várias medidas, destacando-se o uso de sementes saudáveis, rotação de culturas, controle químico e emprego de cultivares resistentes (REY; BALARDIN; PIEROBOM, 2005; STENGLEIN et al., 2003). No entanto, alguns fatores dificultam o controle dessa doença, tais como: elevada capacidade de sobrevivência do patógeno, eficiência na transmissão através das sementes e, principalmente, ampla variabilidade patogênica (DILLARD; COBB, 1993), o que constitui-se no principal fator limitante na utilização de cultivares que apresentam resistência genética a várias raças do patógeno (SOMAVILLA; PRESTES, 1998).

2.3 Crestamento bacteriano comum

O crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith), é a principal bacteriose do feijoeiro no Brasil (RAVA; SARTORATO, 1994; SILVA et al., 2013). Diferenças em perdas de rendimento ocorrem devido à considerável variabilidade nos fatores ambientais, tendo a temperatura como determinante (WALLEN; GALWAY, 1977). As perdas causadas pelo CBC normalmente variam de 10 a 45% (GILLARD et al., 2009), em alguns casos podendo chegar a 70% de perda no peso de grãos (TOILLER et al., 2010), tais perdas de rendimento explicadas principalmente em razão da redução da taxa fotossintética das folhas infectadas (DIAZ et al., 2001). Os sintomas aparecem em toda a parte aérea da planta, começando com manchas encharcadas nas folhas, que aumentam em tamanho e progridem para necróticas que podem apresentar um tênue halo amarelado. As lesões podem estar esparsas no limbo, bem como na parte marginal, progredindo para o centro dos folíolos (VIEIRA; HEMP; NADAL, 1992; KIMATI et al., 2005).

A doença tem disseminação mundial, principalmente nas regiões quentes e úmidas (FANCELLI; DOURADO NETO, 2007). A importância do CBC tem sido descrita em razão da dificuldade de controle da doença, pois no caso de bacterioses o controle químico, tanto para tratamento de sementes quanto para pulverizações foliares, é economicamente inviável e ineficiente na maioria dos casos (MOURA; CORRÊA; DENARDIN, 2009). Além disso, a maioria das cultivares de feijoeiro em uso no país são suscetíveis a XAP (CEPEF, 2000). Portanto, as medidas de controle empregadas usualmente são as de caráter preventivo (MARINGONI; LAURETTI, 1999).

2.4 Controle biológico de fitopatógenos

O uso de fungicidas nem sempre fornece controle satisfatório para certos fitopatógenos e podem ter efeitos adversos sobre organismos não-alvos (NASEBY; PASCUAL; LYNCH, 2000), o que tem levado à uma crescente preocupação com o ambiente no que se refere ao uso indiscriminado de agroquímicos, o qual pode acarretar em problemas ambientais (ZILLI et al., 2003). Nesse contexto, o controle biológico surge como uma estratégia interessante para o controle de doenças, uma vez que se torna uma alternativa para reduzir o potencial de dano das doenças sem efeitos nocivos para o ambiente (HARMAN et al., 2004; WU et al., 2014; KHEM; SAMSBER; 2015).

Dentre os microrganismos utilizados como agentes de biocontrole, as bactérias destacam-se por atuarem por meio de diferentes mecanismos de ação, tais como parasitismo, antibiose, competição ou indução de resistência (KUMAR et al., 2012; JI et al., 2013). O controle biológico ocorre de maneira direta quando o antagonismo envolve o binômio antagonista-patógeno, e de maneira indireta, quando envolve o trinômio antagonista-planta-patógeno, por meio de indução de resistência (DUFFY; KEEL; DÉFAGO, 2004). De acordo com Romeiro (2007), o antagonismo direto pode envolver diferentes mecanismos de ação como: produção de substâncias antimicrobianas, produção de compostos antimicrobianos voláteis, a competição por nutrientes e por nichos ecológicos, produção de enzimas líticas, sideróforos, ácido cianídrico ou toxinas, parasitismo, hiperparasitismo, predação e interferência no

fenômeno de *quorum sensing*, e o antagonismo indireto envolve ativadores químicos que induzem resistência a fitopatógenos.

No entanto, o uso do controle biológico em substituição ao químico é dependente da disponibilidade e da efetividade dos agentes de biocontrole, bem como dos produtos comerciais, contendo estes microrganismos (KÖHL et al., 2011); e como visto anteriormente, os produtos biológicos registrados no Brasil para a cultura do feijão são escassos (AGROFIT, 2017). Na busca por procariotos com essa finalidade, o grupo de pesquisa “Controle Biológico de Doenças de Plantas e Promoção de Crescimento Vegetal” da Universidade Federal de Pelotas, selecionou bactérias eficientes quando utilizadas individualmente ou em combinação para microbiolizar sementes de feijão, controlando doenças como o crestamento bacteriano comum (ZANATTA, 2004; SANTOS, 2006; CORRÊA, 2007), mancha angular, podridão cinzenta, murcha de curtobactério, murcha de fusário (CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014) e nematoide das galhas (CORRÊA et al., 2012). Foram também realizados ensaios mostrando o potencial de uso dessas bactérias, tanto isoladas quanto combinadas, para pulverização foliar, visando o controle do crestamento bacteriano comum (CBC) e antracnose (ANACKER, 2013; SANGIOGO, 2015; BERMÚDEZ, 2016). A vantagem neste método de aplicação está na possibilidade de poder fazer aplicações periódicas após o estabelecimento da cultura e, também, por tornar possível o confronto direto por meio de mecanismos como a competição, parasitismo e antagonismo, quando o alvo for doenças da parte aérea (BERMÚDEZ, 2016).

Diante das vantagens que o controle biológico pode oferecer, ainda há alguns fatores que limitam a utilização desta ferramenta com mais frequência na agricultura do nosso país, algumas dessas limitações são inerentes no uso de organismos vivos (NEERAJA et al., 2010). Sabe-se que mudanças no clima afetam o desenvolvimento de doenças de plantas e de microrganismos (GURR; SAMALOVA; FISHER, 2011; BRADLEY et al., 2012; MATYSSEK et al., 2012). As mudanças no clima podem impactar as doenças de plantas em diferentes aspectos, entre os principais destacam-se os danos causados por elas e na distribuição geográfica destas, na eficácia dos métodos de controle e nos demais organismos que interagem com a planta, como micorrizas, rizobactérias, antagonistas e endofíticos, entre outros (CHAKRABORTY; TIEDEMANN; TENG, 2000; CHAKRABORTY, 2001).

Em geral, a literatura ainda dispõe de poucas informações sobre os efeitos de mudanças climáticas em relação ao controle biológico de doenças de plantas (GOLDSON, 2007). No entanto, Bettiol e Ghini (2009) discutem que, de modo geral, as mudanças climáticas serão benéficas para o controle biológico, tanto natural, quanto o introduzido, pois as atenções da sociedade para os problemas ambientais exigirão medidas que minimizem o lançamento de poluentes. Com isso, o equilíbrio biológico dos sistemas agrícolas será beneficiado levando a um aumento da complexidade do sistema, e conseqüentemente, ao controle biológico. Para Chakraborty (2001), diante dos possíveis efeitos das mudanças climáticas, no controle biológico natural e nas opções de controle químico, novas estratégias deverão ser estudadas e, para tanto, deve-se estar preparado para enfrentar o novo problema que pode alterar o manejo de doenças de plantas.

Visto que o cultivo do feijão possui notória importância socioeconômica, pois a maioria da produção ainda é oriunda de pequenas propriedades rurais, a seleção de biocontroladores eficientes e adaptados a diferentes condições climáticas estabelecerá base para o desenvolvimento de uma tecnologia de baixo impacto ambiental, mais barata, e de fácil aplicação para o controle de doenças. Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar *in vitro*, a capacidade de produção de compostos relacionados ao biocontrole, e o biocontrole *in vivo*, de bactérias pré-selecionadas como biocontroladoras de doenças da cultura do feijão, sob diferentes condições de temperatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolados bacterianos e condições de cultivo

Para realização dos experimentos foram utilizados oito isolados bacterianos, DFs93 (*Bacillus cereus* Frankland & Frankland), DFs348 (*Bacillus* sp.Cohn) DFs769 (*B.cereus*), DFs513 (*Pseudomonas veronii* Elomari), DFs831 (*P. fluorescens* Migula), DFs842 (*P.fluorescens*), DFs843 (*Rhodococcus* sp. (Tilford) Goodfellow) e DFs912 (*Rhodococcus* sp.), pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Pelotas, reconhecidamente capazes de exercer o biocontrole em diferentes doenças do feijoeiro (ZANATTA et al., 2007; CORRÊA et al., 2008; 2012; 2014).

Como meio básico para os ensaios foi utilizado o Ágar-nutriente (AN) (Difco™), onde os isolados foram repicados em “spots” com alça de platina e, quando em meio líquido, foi preparado caldo nutriente (CN) (5 g de peptona, 3 g de extrato de carne e 2,5 g de glicose solubilizados em 1000 mL de água destilada) e a repicagem foi feita através da deposição de uma alçada da massa bacteriana.

Para proporcionar diferentes temperaturas de crescimento dos biocontroladores, foram utilizadas incubadoras tipo BOD e agitadores orbitais (quando em meio líquido), ajustados a 17°C, 22°C, 27°C, 32°C e 37°C (variação de +/- 2°C).

3.2 Avaliação qualitativa do crescimento em função da temperatura

Para avaliação da capacidade das bactérias de crescerem sob diferentes temperaturas, os isolados foram repicados em placas de Petri contendo AN, incubadas em BOD. A avaliação foi qualitativa, observando-se a formação ou não de colônia em até 72 horas de incubação.

Para as bactérias que não cresceram após este período, as placas foram transferidas para a temperatura de 27°C, para avaliar a sobrevivência, observando-se a ocorrência ou não da formação de colônia.

3.3 Avaliação quantitativa do crescimento em função da temperatura

Para avaliação do crescimento quantitativo em função da temperatura, as bactérias (as quais houve crescimento na avaliação qualitativa) foram repicadas em tubo de ensaio contendo CN e incubadas em agitador orbital com agitação contínua sob as diferentes temperaturas. As avaliações foram feitas às 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a incubação, medindo-se a absorbância (A_{540}) em espectrofotômetro.

3.4 Avaliação da motilidade em diferentes temperaturas

Para o teste de avaliação da motilidade tipo swarming, foi utilizado meio de cultura Lúria-Bertani (LB) a 0,6% de Ágar, vertido em placas de Petri que permaneceram em repouso por 30 minutos (D'AES et al., 2014).

Alíquotas 1,5 mL de cada suspensão bacteriana cultivadas por 48 horas em meio líquido foram centrifugadas a 14000 rpm durante três minutos e ressuspendidas com solução salina (NaCl 0,85%). Após o procedimento a suspensão foi centrifugada (14000 rpm durante três minutos) e ressuspendida novamente. Da suspensão foram pipetados 5 μ L e depositados no centro das placas, as quais foram incubadas em BOD por 24 horas nas diferentes temperaturas. A avaliação foi feita através da medição das colônias formadas em dois sentidos diametralmente opostos.

3.5 Avaliação da produção de compostos relacionados ao biocontrole de fitopatógenos em função da temperatura

Foi avaliada a capacidade das bactérias biocontroladoras em produzir enzimas hidrolíticas e compostos antimicrobianos. Para isso, foram utilizados meios específicos para cada composto, vertidos 18 horas antes do uso e mantidas a 28 °C para redução da umidade superficial. Nestas placas os isolados bacterianos foram semeados em “spots”. Para o controle foram repicadas bactérias com atividade sabidamente positiva e negativa para a produção do composto a ser avaliado. Após a semeadura das bactérias, as placas foram incubadas nas BODs programadas com as temperaturas correspondentes aos tratamentos e observadas diariamente.

As avaliações foram quantitativas ou qualitativas. Quando quantitativas foram realizadas medições dos diâmetros das colônias ($\varnothing C$) e dos halos formados ($\varnothing H$) em dois sentidos diametralmente opostos. Neste caso, os resultados foram expressos como diâmetro relativo de halo ($\varnothing RH$), calculado pela seguinte fórmula: $\varnothing RH = (\varnothing H - \varnothing C) / \varnothing C$. As avaliações qualitativas foram registradas como ocorrência ou não de halo de degradação ao redor das colônias.

3.6 Avaliação da produção de enzimas hidrolíticas

3.6.1 Hidrólise de carboidrato estrutural

Para avaliar a produção de quitinases pelos diferentes isolados foi utilizado o meio de quitina (0,5%), de acordo com a metodologia descrita por Cattelan (1999), e neste caso, a avaliação foi qualitativa.

3.6.2 Hidrólise de proteína

A capacidade proteolítica foi avaliada utilizando-se a caseína como substrato, em meio de cultura Leite-Ágar (MARIANO; SILVEIRA, 2005). A avaliação da hidrólise foi realizada pela observação de alteração do meio, de leitoso para translúcido (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001), e neste caso a avaliação foi

quantitativa, medindo-se os diâmetros das colônias ($\varnothing C$) e dos halos formados ($\varnothing H$) em dois sentidos diametralmente opostos.

3.6.3 Hidrólise de lipídeo

Para tal, foi utilizado como base o meio lecitina a 4%, obtido através da adição de solução de gema de ovo 50% enriquecido com 1% de telurito (LABORCLIN®) no meio de cultura ágar-nutriente (SCHAAD; JONES; CHUN, 2001). A avaliação foi baseada na presença de halo de degradação do meio de cultura ao redor das colônias de forma quantitativa, medindo-se os diâmetros das colônias ($\varnothing C$) e dos halos formados ($\varnothing H$) em dois sentidos diametralmente opostos.

3.7 Produção de compostos antimicrobianos

3.7.1 Produção de Sideróforos

Foi utilizado meio King B + azul de cromoazurol (SCHWYN; NEILANDS, 1987), onde os isolados biocontroladores foram semeados nas placas e incubados em BOD no escuro por 72 horas (CATTELAN, 1999). A avaliação foi baseada na presença de halo avermelhado ao redor das colônias de forma quantitativa, medindo-se os diâmetros das colônias ($\varnothing C$) e dos halos formados ($\varnothing H$) em dois sentidos diametralmente opostos.

3.7.2 Produção de amônia

Os isolados biocontroladores foram repicados em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo de peptona incubados em agitador orbital com agitação contínua sob as temperaturas a serem testadas. As avaliações foram efetuadas após 24, 48, 72 e 96 horas, retirando-se alíquotas de 1 mL dos cultivos e adicionando-se 100 μL do reagente de Nessler (MARIANO; SILVEIRA, 2005). As avaliações foram qualitativas, onde a ocorrência de precipitado alaranjado indicou resultado positivo.

3.8 Antibiose *in vitro*

3.8.1 Antibiose por meio de compostos voláteis

Para realização deste ensaio foram utilizadas placas bipartidas contendo meio AN, onde de um lado foram semeados 100µL de cultura da bactéria biocontroladora, e na outra metade foi repicado um disco de micélio do fungo patogênico *Colletotrichum lindemuthianum* (CL). A placa foi coberta por uma tampa de mesmo tamanho e vedada com fita adesiva, após as placas foram incubados em BOD com fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação foi realizada medindo-se o raio do crescimento fúngico no momento em que o CL do tratamento testemunha atingiu os bordos da placa. Neste ensaio foram utilizadas somente as temperaturas as quais o fungo foi capaz de se desenvolver (17°C, 22°C e 27°C). A testemunha foi constituída por placas onde o patógeno foi repicado na ausência das biocontroladoras, e a avaliação foi realizada após 20 dias, medindo-se o raio do micélio do fungo. Os resultados foram representados em porcentagem de redução do crescimento fúngico, calculado da seguinte maneira: $\% \text{Redução} = 100 - [(\text{Crescimento fúngico} \times 100) / \text{Crescimento fúngico da testemunha}]$.

3.8.2 Antibiose por pareamento

A atividade antifúngica dos isolados foi analisada pelo confronto direto em placas de Petri contendo meio AN. Os isolados foram repicados em “spots” a aproximadamente 15 mm de distância do bordo da placa e, no lado oposto a esse a 40 mm de distância, foi depositado um disco de micélio de 4 mm de diâmetro de CL retirado das bordas de colônias crescidas previamente a 22°C durante dez dias. Como testemunha o disco de micélio do fungo foi depositado em placas com AN na ausência das biocontroladoras. As placas foram incubadas em BOD com fotoperíodo de 12 horas, sob as temperaturas nas quais o fungo foi capaz de se desenvolver (17°C, 22°C e 27°C). A avaliação foi realizada após 20 dias, medindo-se o raio do micélio do fungo. Os resultados foram representados em porcentagem de redução do crescimento fúngico, calculado da seguinte maneira: $\% \text{Redução} = 100 - [(\text{Crescimento fúngico do tratamento} \times 100) / \text{Crescimento fúngico da testemunha}]$.

3.9 Biocontrole *in vivo* (folhas destacadas de feijão)

Sementes de feijão da cultivar BRS Valente foram semeadas em vasos de 2 L contendo mistura 1:3 de substrato comercial e solo não autoclavado. Após o desenvolvimento inicial das plantas de feijão (15 dias após a semeadura), as folhas cotiledonares foram destacadas e colocadas em Gerbox previamente desinfestados, contendo em seu interior duas folhas de papel Mata Borrão umedecidos com água estéril (ZANATTA et al. 2007). As folhas cotiledonares foram pulverizadas (face adaxial e abaxial) com suspensão bacteriana dos biocontroladores, ajustada em espectrofotômetro ($A_{540}=0,4$), 48 horas antes da inoculação do patógeno e incubadas nas diferentes temperaturas. Após este período as plantas foram inoculadas com o patógeno e incubadas à 22°C no ensaio para CL e à 27°C no ensaio para XAP.

Para a produção de esporos de CL, o isolado fúngico foi cultivado em tubos de ensaio contendo meio de cultura de Mathur, Barnett e Lilly (1950) e pedaços de vagens estéreis sob temperatura de 22°C, durante 15 dias e fotoperíodo de 12 horas. A suspensão de esporos foi preparada com água destilada e Tween 20 (uma gota para cada 100 mL de suspensão) e ajustada para concentração 10^5 esporos mL^{-1} , utilizando-se para isso Câmara de Neubauer. A inoculação foi feita pulverizando-se as faces adaxial e abaxial das folhas cotiledonares com aproximadamente 1,5 mL da suspensão de conídios e água estéril para as testemunhas. A severidade foi avaliada visualmente, a cada dois dias após o início dos sintomas, utilizando a escala diagramática descrita por Dalla Pria et al. (1999).

O bioensaio para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP) seguiu de maneira semelhante, no entanto, a inoculação do patógeno foi realizada pelo método do corte com tesoura, (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), com suspensão bacteriana ajustada em espectrofotômetro ($A_{540}=0,2$), num total de cinco cortes por folha cotiledonar. Neste ensaio, além da testemunha inoculada com o patógeno na ausência das biocontroladoras foi feita também a testemunha absoluta, no qual as folhas foram cortadas com tesoura somente com água estéril. As avaliações de severidade foram realizadas a cada dois dias após o início dos sintomas, atribuindo-se nota para cada corte de acordo com escala descritiva de Rava (1984).

A partir das notas de severidade, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) de acordo com a equação de CAMPBELL e MADDEN (1990).

3.10 Procedimentos Estatísticos

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com oito repetições para os ensaios *in vitro* e em blocos casualizados, com oito repetições, em esquema fatorial para os ensaios *in vivo*. A parcela experimental foi representada por cada placa de Petri, tubo de ensaio ou gerbox com duas folhas cotiledonares. Exceto para as curvas de crescimento e bioensaio, todos os testes *in vitro* foram repetidos.

Foi realizada análise de normalidade e homocedasticidade dos dados e, quando necessário, os mesmos foram transformados de acordo Box-Cox(Box-Cox), exceto os dados de severidade da antracnose, que foram transformados por $\log(x+0.5)$ devido à escala utilizada.

Para os ensaios de produção de compostos antimicrobianos *in vitro*, o efeito das temperaturas foi avaliado por meio de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Para os ensaios de antibiose *in vitro* os tratamentos foram comparados com a testemunha pelo teste de Dunnett e as testemunhas foram submetidas à análise de variância ($p \leq 0,05$) para a variável temperatura e, havendo diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Para os bioensaios *in vivo*, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ($p \leq 0,05$).

Os procedimentos estatísticos foram realizados pelo programa R (R Core Team, 2016).

4. RESULTADOS

4.1 Crescimento qualitativo

Todos os isolados avaliados cresceram na faixa de temperatura entre 17 e 32°C, porém, a 37°C somente as bactérias do gênero *Bacillus* (DFs93, DFs348 e DFs769) formaram colônias. Após o período de 72 horas, as bactérias que não cresceram a 37°C graus, quando incubadas novamente em temperatura ótima (27°C) voltaram a se desenvolver e, portanto a temperatura não foi letal (Tab. 1). Sendo assim, para os isolados que não cresceram a 37°C, esta temperatura foi excluída dos ensaios *in vitro*.

Tabela 1 – Crescimento qualitativo dos isolados biocontroladores cultivadas em meio ágar nutriente por 72 horas em diferentes temperaturas de incubação

Isolado	Temperatura °C					Re-Incub. (27)
	17	22	27	32	37	
DFs093	+	+	+	+	+	
DFs348	+	+	+	+	+	
DFs513	+	+	+	+	-	+
DFs769	+	+	+	+	+	
DFs831	+	+	+	+	-	+
DFs842	+	+	+	+	-	+
DFs843	+	+	+	+	-	+
DFs912	+	+	+	+	-	+

Re-Incub.-Bactérias que não cresceram a 37°C foram incubadas novamente na temperatura de 27°C; Avaliação qualitativa, resultados expressos como positivos (+) ou negativos (-); DFs093-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*

4.2 Crescimento quantitativo

Na avaliação quantitativa do crescimento dos isolados, observa-se que, na temperatura de 17°C houve aumento da duração da fase lag de crescimento para todos os isolados, principalmente para os isolados do gênero *Rhodococcus* (DFs843 e DFs912). Para estes dois isolados e para DFs093 (*Bacillus sp.*), após 48 horas de incubação não foi possível alcançar a fase estacionária. Atraso nas fases lag e log também ocorreu na temperatura de 22°C, porém em menor intensidade. De maneira geral, os isolados apresentaram maiores absorbâncias na temperatura de 32°C, e redução intensa a 37°C. Os isolados de *Pseudomonas* apresentaram absorbância máxima similar nas diferentes temperaturas, com exceção DFs513 crescendo a 22°C (valor máximo). Os isolados de *Rhodococcus*, além de não crescerem a 37°C, apresentaram intensa redução na velocidade de crescimento (Fig. 1).

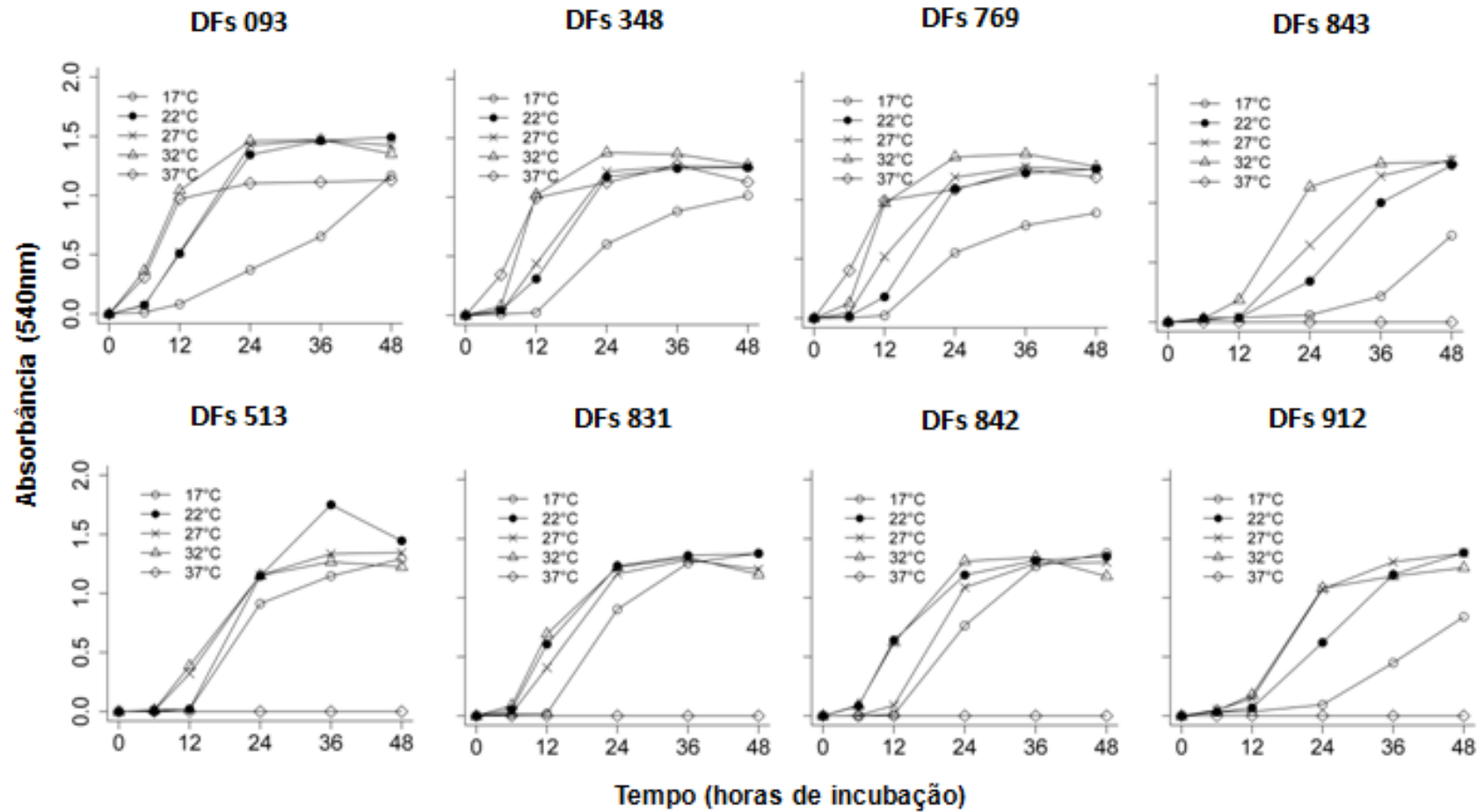


Figura 1 - Curva de crescimento dos isolados biocontroladores medido por meio da absorbância (A_{540}) após 6, 12, 24, 36 e 48 horas de incubação em meio caldo nutriente sob agitação contínua (100 rpm) em diferentes temperaturas (17, 22, 27, 32 e 37°C). DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp.

4.3 Motilidade

De maneira geral para os isolados de gênero *Bacillus* e *Rhodococcus* foi observado uma crescente motilidade tipo *swarming* com a elevação das temperaturas. Para os isolados DFs513 e DFs842 (*Pseudomonas* sp) a maior motilidade foi verificada na temperatura de 22°C e para o isolado DFs831, a temperatura não causou diferenças significativas na motilidade (Fig. 2).

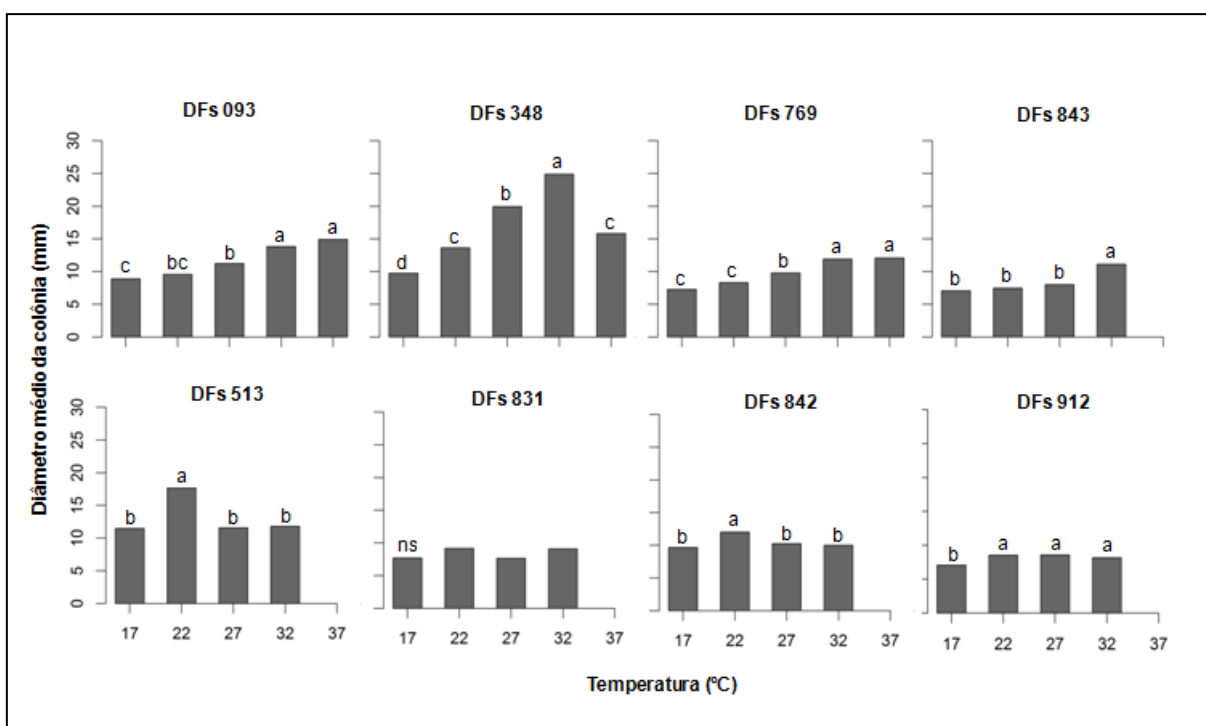


Figura 2- Motilidade do tipo *swarming* dos isolados biocontroladores após 24 horas de incubação em meio LB (0,6%) sob diferentes temperaturas. DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp.

4.4 Produção de enzimas hidrolíticas: quitinases, caseinases e lecitinases

A avaliação da capacidade de hidrólise de quitina foi realizada aos 28 dias de incubação, e dos oito isolados estudados apenas os do gênero *Bacillus* apresentaram resultado positivo (DFs93, DFs348 e DFs769) (Tab. 2). De modo geral a temperatura teve pouca influência na capacidade hidrolítica destes isolados, exceto para DFs348, onde na temperatura de 17°C a hidrólise de quitina não foi observada.

Tabela 2 - Capacidade de produção de quitinase dos isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação, após 28 dias em meio de quitina (0,5%)

Isolado	Temperatura °C				
	17	22	27	32	37
DFs093	+	+	+	+	+
DFs348	-	+	+	+	+
DFs513	-	-	-	-	nc
DFs769	+	+	+	+	+
DFs831	-	-	-	-	nc
DFs842	-	-	-	-	nc
DFs843	-	-	-	-	nc
DFs912	-	-	-	-	nc

Avaliação qualitativa, resultados expressos como positivos (+) ou negativos (-); (nc) Isolados que não cresceram a 37°C no ensaio de crescimento qualitativo; DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*

Para a hidrólise de caseína a avaliação dos isolados incubados a 37 e 32°C ocorreu às 24 horas de incubação. Para 27°C, após quatro dias de incubação e para 17 e 22°C após seis dias de incubação. Seis dos oito isolados estudados apresentaram esta capacidade: DFs93, DFs348, DFs513, DFs769, DFs831, DFs842, sendo que para a maioria destes isolados os maiores halos relativos foram obtidos nas temperaturas mais baixas (17 e 22°C). Somente para DFs831 e DFs842, que os maiores ØRH foram obtidos em temperaturas intermediárias (22 e 27°C). Quanto à capacidade da hidrólise, apenas na temperatura de 32°C não foi observada a hidrólise da caseína pelos isolados DFs513 e DFs831, ambos pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (Fig. 3).

Os mesmos seis isolados capazes de hidrolisar caseína apresentaram também capacidade de hidrólise de lecitina (Fig. 4). A avaliação dos isolados incubados a 37 e 32°C ocorreu após quatro dias de incubação; para 27 e 22°C, após seis dias de incubação e, para 17°C, após dez dias de incubação. A temperatura exerceu influência maior sobre a capacidade de hidrólise deste composto, sendo que para DFs348, na temperatura de 17°C, não foi observado halo de degradação; para DFs831, também não foi verificado resultado positivo nas temperaturas de 17 e 22°C e, para DFs842, a capacidade de degradar lecitina foi observada apenas na temperatura de 27°C. Para os isolados de *Bacillus* (DFs093, DFs348 e DFs769) a intensidade de degradação reduziu com aumento da temperatura e para os de

Pseudomonas foi variável, sendo que para DFs513 foi reduzida nas temperaturas intermediárias.

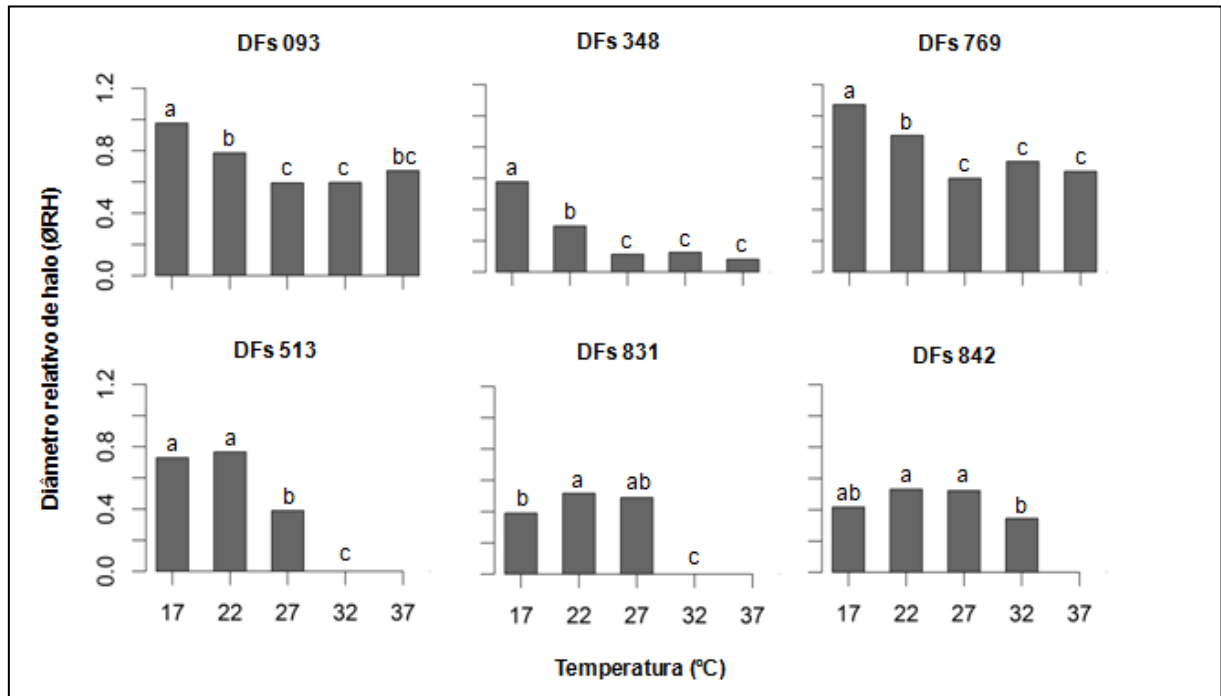


Figura 3 - Produção de caseinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de cultura Leite-Ágar. DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*

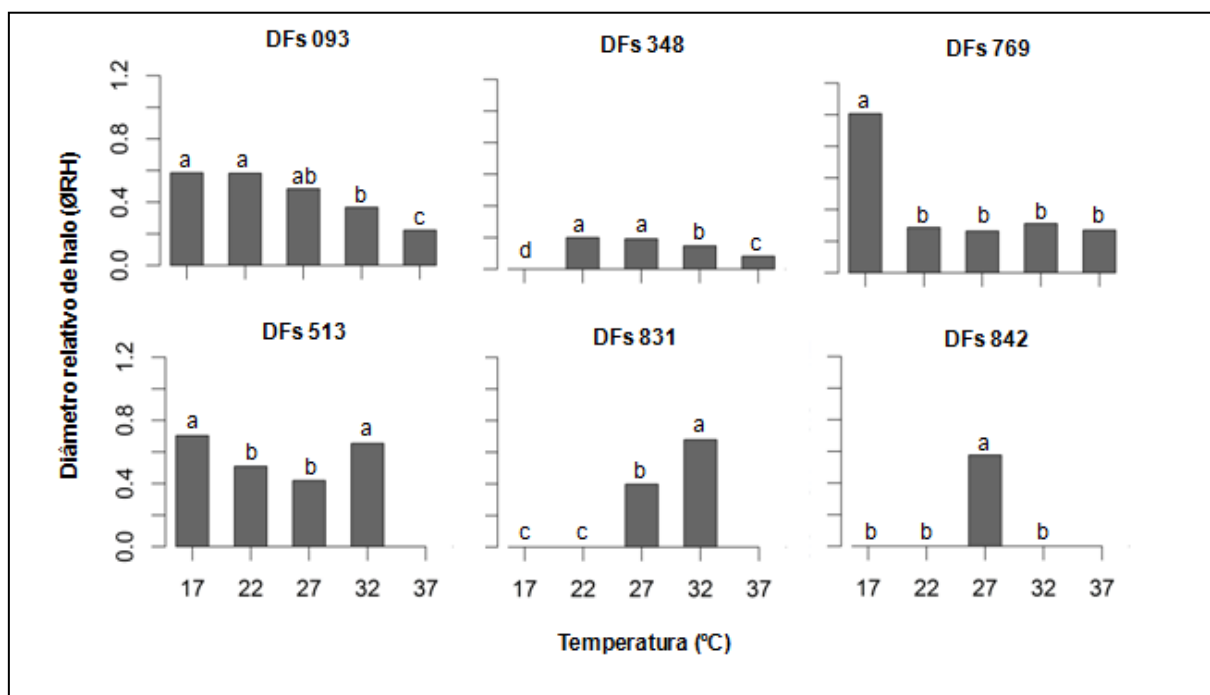


Figura 4 - Produção de lecitinase de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio de lecitina (4%). DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp.

4.5 Produção de sideróforos

A avaliação da produção de sideróforos foi realizada às 72 horas de incubação para todas as temperaturas. Os três isolados do gênero *Pseudomonas* (DFs513, DFs831 e DFs842) produziram sideróforos em todas as temperaturas no qual se desenvolveram (17 a 32°C) (Fig. 5), com menores valores para DFs513 e DFs842 na temperatura de 27°C. Para o isolado DFs831, a temperatura não teve influencia no ØRH.

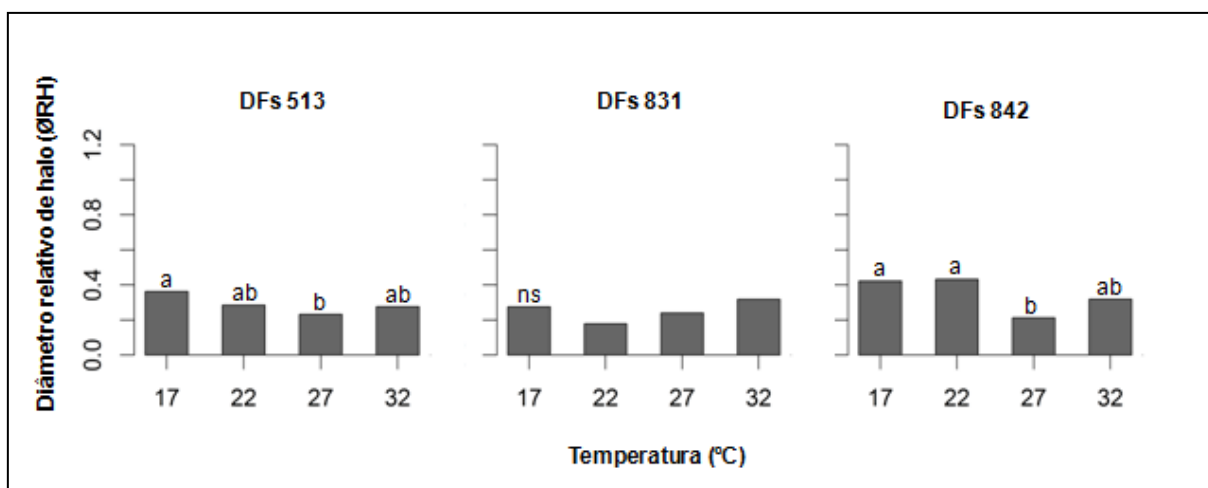


Figura 5 - Produção de sideróforos de isolados biocontroladores em diferentes temperaturas de incubação em meio King concentrado acrescido de corante CAS. DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*

4.6 Produção de Amônia

A temperatura não influenciou na capacidade dos biocontroladores em produzir amônia, pois todos isolados testados apresentaram resultado positivo, independente da temperatura de crescimento. Porém, houve influência da temperatura em relação ao tempo necessário para detectar a produção deste composto (Tab. 3).

Tabela 3 - Quantidade de horas necessárias para a detecção da produção de amônia dos isolados biocontroladores incubados sob agitação orbital (100rpm) em diferentes temperaturas

Isolado	Temperatura °C				
	17	22	27	32	37
DFs093	24h	24h	24h	24h	24h
DFs348	36h	24h	24h	24h	24h
DFs513	48h	24h	24h	36h	nc
DFs769	48h	24h	24h	24h	24h
DFs831	48h	24h	24h	24h	nc
DFs842	48h	24h	24h	36h	nc
DFs843	84h	72h	72h	72h	nc
DFs912	84h	72h	72h	72h	nc

Avaliação qualitativa, resultados expressos como quantidade de horas necessárias para visualização do resultado positivo; (nc) Isolados que não cresceram a 37°C no ensaio de crescimento qualitativo; DFs93-*Bacillus Cereus*; DFs348-*Bacillus sp.*; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus sp.*; DFs912-*Rhodococcus sp.*

Quanto ao período necessário para a produção da amônia, destacou-se o isolado DFs093 (*Bacillus cereus*), o qual não foi influenciado por nenhuma das temperaturas testadas, sendo detectada a produção em 24h de incubação. Para os isolados DFs348 e DFs769, também do gênero *Bacillus*, foi necessário maior período de incubação apenas na temperatura de 17°C. Os isolados do gênero *Pseudomonas* (DFs513, DFs831 e DFs842) tiveram comportamento semelhante, uma vez que apresentaram atraso na produção de amônia na temperatura de 17°C, e para DFs513 e DFs842 à 32°C. Nas demais temperaturas a detecção foi observada às 24 horas de incubação. Para os isolados do gênero *Rhodococcus* (DFs843 e DFs912), a detecção da produção da amônia ocorreu somente após 72 horas de incubação, posterior aos demais isolados, sendo que nas temperaturas de 17°C foi necessário ainda mais tempo de incubação (84 horas).

4.7 Antibiose por meio de compostos voláteis

Na antibiose por meio de compostos voláteis, todas as biocontroladoras diminuíram significativamente o raio da colônia do fungo em comparação com a testemunha nas três temperaturas estudadas, exceto DFs912 na temperatura de 17°C (Fig.6). Observou-se aumento do percentual de controle com o aumento da temperatura de incubação. Para os dois ensaios, o crescimento fúngico (testemunha) não foi afetado pela variação da temperatura.

4.8 Antibiose por pareamento

No ensaio da antibiose por pareamento, quando incubados na temperatura de 17°C todos os tratamentos, exceto DFs843 e DFs912, causaram redução significativa do crescimento do fungo. Quando incubados a 22 e 27°C, somente DFs843 não reduziu significativamente o crescimento do fungo (Fig. 7). Maiores porcentagens de controle foram observadas com o aumento da temperatura de incubação. Neste ensaio, o crescimento fúngico (testemunha) não foi afetado pela variação da temperatura.

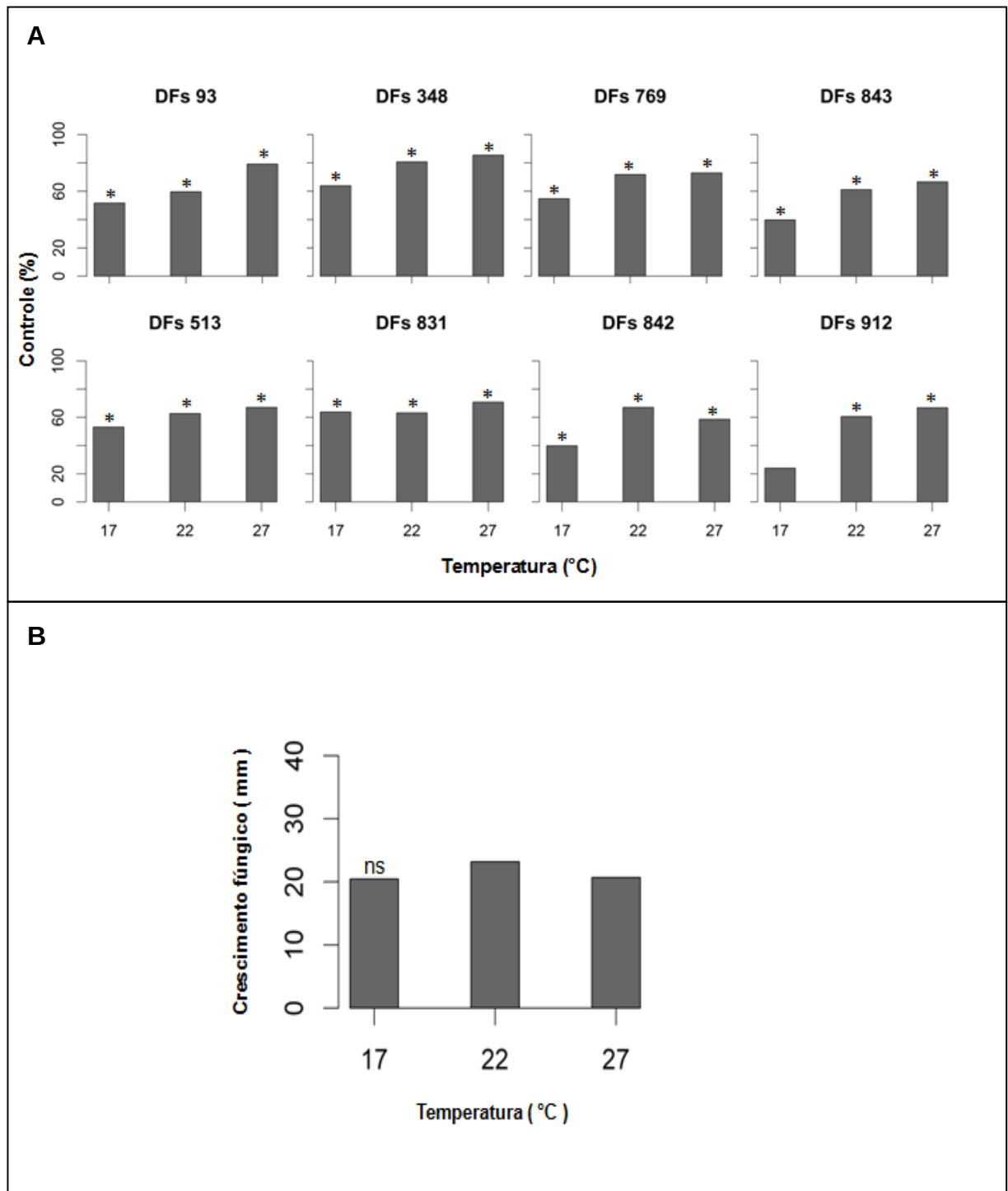


Figura 6 - (A) Porcentagem de redução do crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* pelos isolados biocontroladores por meio de compostos voláteis após 20 dias de incubação em placas de Petri divididas contendo ágar nutriente sob diferentes temperaturas. *Médias diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp. (B) Crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* em função de diferentes temperaturas de incubação em placas divididas contendo ágar nutriente. ^{ns}Médias não diferem estatisticamente entre si.

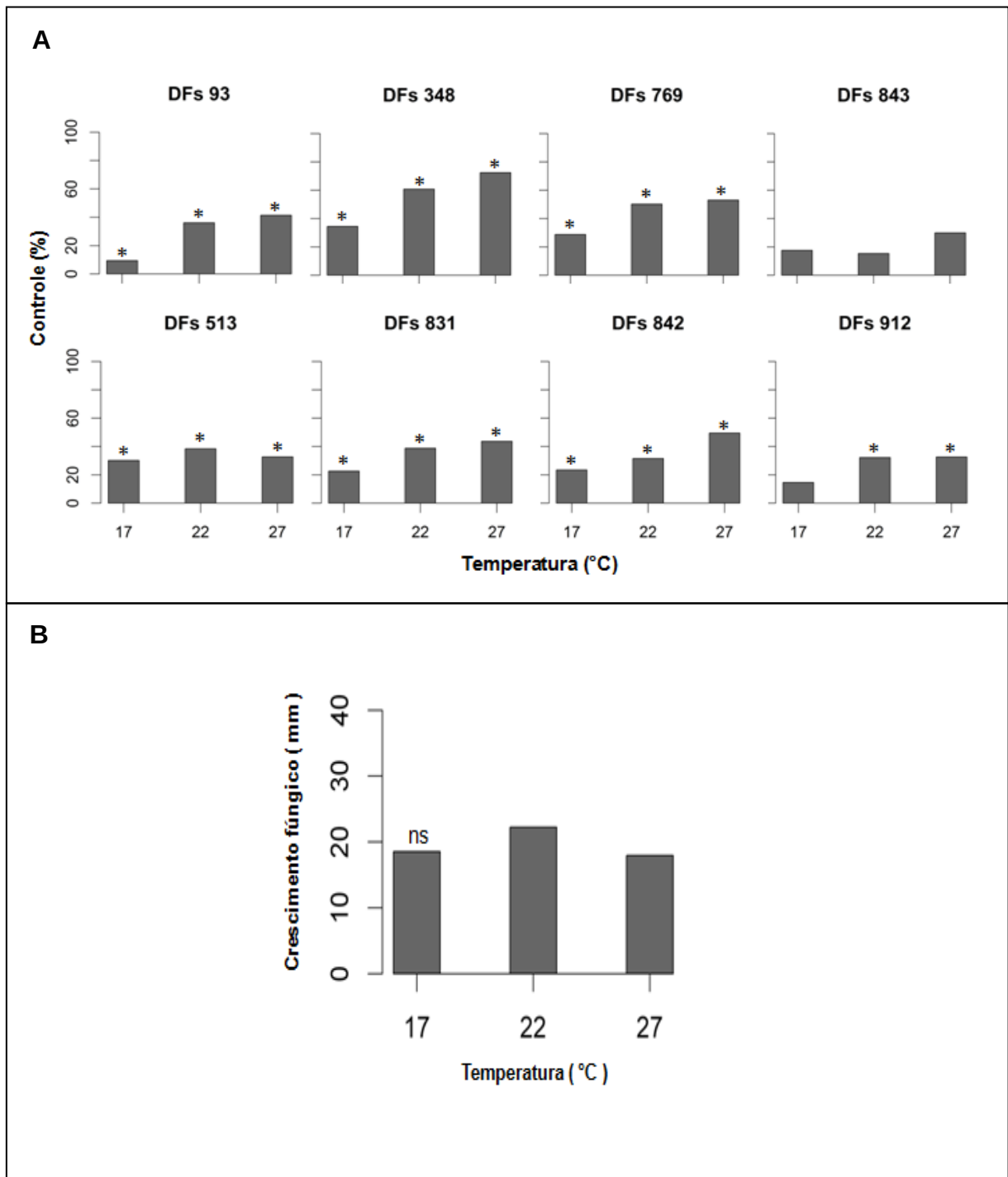


Figura 7 - (A) Porcentagem de redução do crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* pelos isolados biocontroladores por meio de confronto pareado em placas de Petri divididas contendo ágar nutriente após 20 dias de incubação sob diferentes temperaturas. *Médias diferem da testemunha pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$); DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp. (B) Crescimento fúngico de *Colletotrichum lindemuthianum* em função de diferentes temperaturas de incubação em meio ágar nutriente. ^{ns}Médias não diferem estatisticamente entre si.

4.9 Biocontrole *in vivo*

Para a severidade da antracnose e do CBC a interação entre os fatores tratamentos bacterianos e temperatura não foi significativa, portanto foi realizada a análise dos efeitos simples. Houve efeito de tratamentos e de temperatura para a AACPD da antracnose, sendo que todos os tratamentos bacterianos, exceto *Rhodococcus* (DFs843 e DFs912), reduziram significativamente a severidade acumulada dos sintomas, variando de 36 a 65% de controle (em média, 46%) . Para o fator temperatura, a maior AACPD ocorreu quando os tratamentos bacterianos foram submetidos a 37°C antes da inoculação do patógeno (Fig. 8).

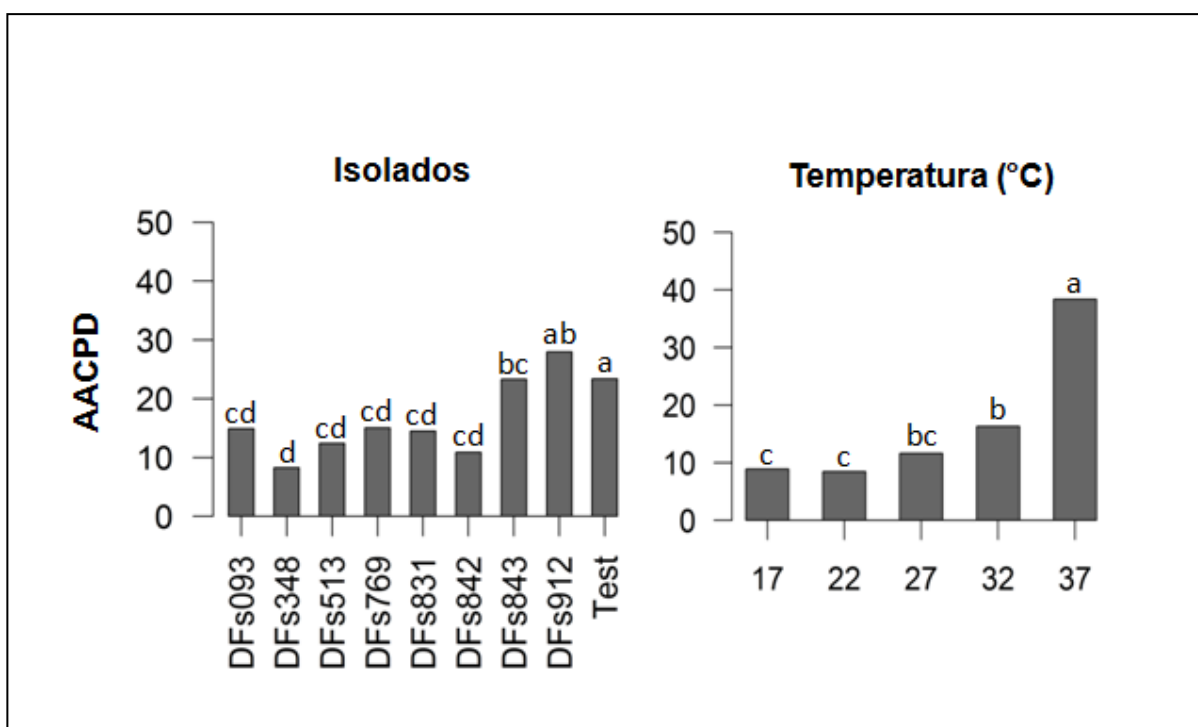


Figura 8 - Severidade acumulada da antracnose representada pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas destacadas de feijão pulverizadas com biocontroladores e submetidas a diferentes temperaturas por 48 horas. Avaliações realizadas ao 5º, 7º, 9º, 11º e 13º dia após a inoculação. Após inoculação as folhas foram incubadas a 22°C. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). Gráficos construídos com dados originais sem transformação. DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843- *Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp.

Para a AACPD do CBC todos os isolados diferiram significativamente da testemunha, sendo que os menores valores de AACPD foram obtidos com os isolados do gênero *Pseudomonas* (DFs831, DFs842 e DFs513), diminuindo em média de 28% a AACPD, juntamente com DFs093 (*Bacillus*), não diferindo entre si.

O aumento da temperatura resultou em crescente aumento da severidade (AACPD), sendo as maiores médias observadas na temperatura de 37°C (Fig. 9).

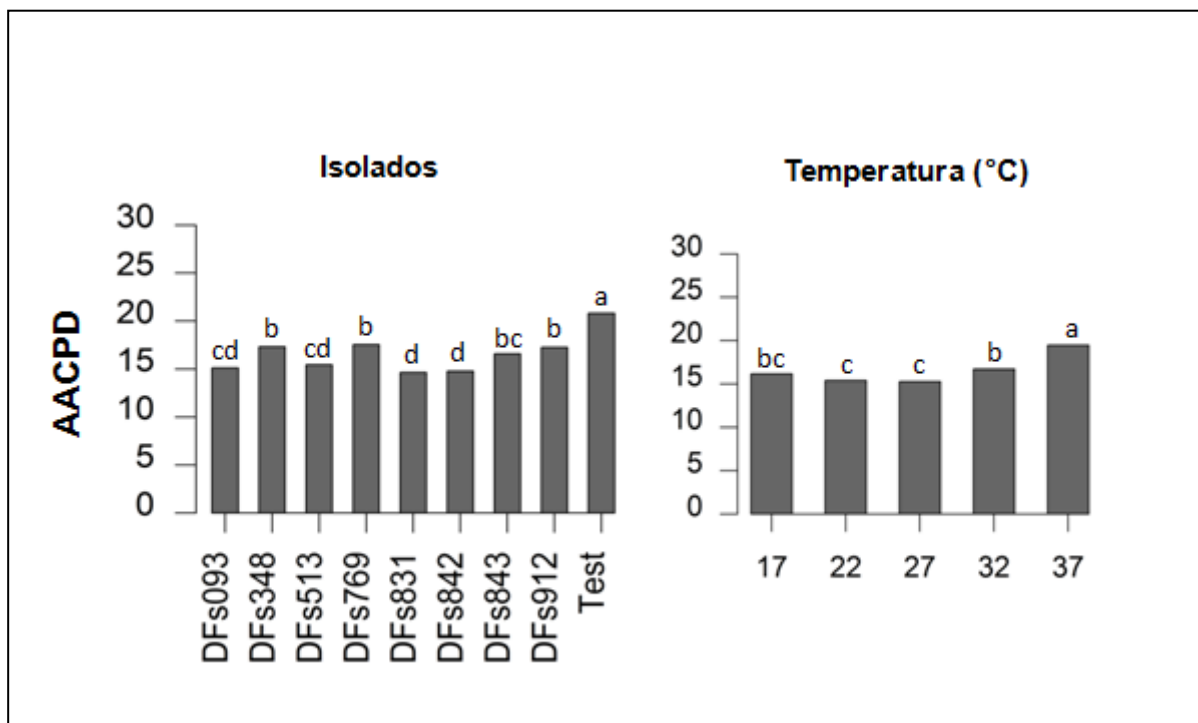


Figura 9 - Severidade acumulada do cretamento bacteriano comum representada pela área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas destacadas de feijão pulverizadas com biocontroladores e submetidas a diferentes temperaturas por 48 horas. Avaliações realizadas ao 3º, 5º, 7º, 9º e 11º dia após a inoculação. Após inoculação as folhas foram incubadas a 27°C. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Duncan ($p < 0,05$). DFs93-*Bacillus cereus*; DFs348-*Bacillus* sp.; DFs769-*Bacillus cereus*; DFs513-*Pseudomonas veronii*; DFs831-*Pseudomonas fluorescens*; DFs842-*Pseudomonas fluorescens*; DFs843-*Rhodococcus* sp.; DFs912-*Rhodococcus* sp.

5. DISCUSSÃO

A grande maioria das bactérias encontradas no ambiente são mesófilas, ou seja, têm temperatura ótima de crescimento entre 25 e 40°C (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Neste estudo, quando incubadas na temperatura de 37°C, somente as bactérias do gênero *Bacillus* formaram colônias. Fato que ocorre devido algumas bactérias possuem mecanismos para poderem se adaptar para enfrentar os desafios de mudança de ambiente e sobreviver sob condições de estresse (ABEE; WOUTERS, 1999). Um exemplo de resposta adaptativa pode ser observado para *B. cereus*, em que um tratamento com dose de calor não-letal inicial pode induzir resistência transitória para um posterior tratamento térmico (com temperatura letal), fenômeno conhecido como termotolerância (PERIAGO et al., 2002). Esse gênero bacteriano possui ainda capacidade de formar endósporos, podendo resistir à altas temperaturas, dessecação e ação de radiação (ABRIOUEL et al., 2011), características importantes que conferem vantagem de sobrevivência para um biocontrolador.

Em alguns casos, no processo de seleção de bactérias biocontroladoras, as candidatas capazes de crescer à temperatura corporal (37°C) são descartadas porque esta característica pode dificultar o registro como produto comercial (BERG et al., 2005; KÖHL et al., 2011). Porém, considerando a elevação das temperaturas devido ao aquecimento global, estas características são interessantes pois aumentam as possibilidades do biocontrolador persistir no filoplano ou solo sob condições de temperaturas mais elevadas, principalmente em regiões tropicais.

O fato dos isolados não terem crescido a 37°C, mas terem se desenvolvido quando incubados novamente em temperatura ótima revela que esta temperatura não é suficiente para causar a morte das bactérias. Neste caso, em uma situação hipotética a campo, em períodos de temperaturas elevadas, mesmo que não

estejam se multiplicando, as bactérias ainda poderiam persistir e voltar a crescer quando as condições ambientais fossem favoráveis.

A avaliação da densidade óptica do meio de cultura pode ser considerada um método eficaz para estimar a quantidade de células bacterianas viáveis somente até a fase estacionária, já que a turbidimetria não é capaz de realizar a discriminação entre as células vivas e as células mortas no meio de cultura (SANTIAGO, et al., 2010). Contudo, por meio das curvas de crescimento é possível conhecer o comportamento de cada isolado estudado, bem como determinar o início e o ponto máximo da fase log do crescimento de cada biocontroladora nas diferentes condições de temperatura.

No ensaio de crescimento quantitativo as maiores absorbâncias ocorreram mais rapidamente nas temperaturas mais elevadas 32 e 37°C. No entanto, temperatura ótima para uma espécie microbiana não é a temperatura mediana entre a máxima e mínima, em vez disso, é mais próxima do limite superior de variação da temperatura, porque a velocidade das reações enzimáticas aumenta com o aumento da temperatura até o ponto em que as enzimas são danificadas pelo calor e as células param de crescer (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1996). Portanto, a temperatura ótima para o crescimento pode não ser a temperatura ideal para toda atividade celular, de tal modo que, em geral, os trabalhos rotineiros realizados no laboratório de bacteriologia são incubados na temperatura de 27°C.

De maneira geral, as temperaturas que apresentam maiores absorbâncias no ensaio de crescimento quantitativo foram também as que proporcionaram maior motilidade do tipo swarming, indicando um efeito da maior população bacteriana, fato que corrobora com a definição deste tipo de motilidade, o qual é o movimento multicelular, ou seja, de um grupo de bactérias pela superfície, diferente da movimentação do tipo *swimming*, que é o movimento individual de bactérias em meio líquido (HARSHEY, 2003; KEARNS, 2010).

Neste mesmo sentido, Puopolo e colaboradores (2013), com o propósito de avaliar o efeito da temperatura na capacidade de movimentação da estirpe S499 de *Bacillus amyloliquefaciens*, mostraram que a motilidade foi influenciada pelas temperaturas, e que a maior temperatura (35°C) determinou a maior motilidade, sendo drasticamente prejudicada quando incubada a 15°C.

A motilidade do tipo swarming é um mecanismo de translocação das bactérias realizado por meio de flagelos rotativos, que são requisito para este tipo de

locomoção (KEARNS, 2010; INOUE et al., 2007). Dentre os tipos de motilidade existentes este é o modo mais rápido para a translocação em superfícies (O'MAY; TUFENKJI, 2011). A motilidade é um fator tão importante que no caso de bactérias patogênicas ela tem sido identificada como um fator relacionado com a virulência (LAI; TREMBLAY; DÉZIEL, 2009; YU et al., 2014), sendo essencial para a patogenicidade bacteriana nas fases iniciais de adesão aos tecidos do hospedeiro (McCARTER, 2001). Assim, a motilidade bacteriana é interessante para as biocontroladoras tanto quando aplicadas no solo quanto no filoplano, pois confere vantagem de sobrevivência sob os diferentes ambientes para competirem com sucesso com outros microrganismos (HARSHEY, 2003).

Após o sucesso em colonizar a superfície, uma biocontroladora deve apresentar a capacidade de causar dano aos fitopatógenos, sendo a produção de enzimas líticas considerada um mecanismo direto de ação do controle biológico (COMPANT et al., 2005). As quitinases bacterianas são enzimas promissoras com capacidade antipafúngica, uma vez que estas degradam quitina, um dos principais constituintes da parede celular fúngica (ZHANG et al., 2001). Portanto os isolados DFs93, DFs348 e DFs769, que produzem quitinases, possuem a capacidade de inibir o crescimento e desenvolvimento de fitopatógenos por meio de ataque direto à parede celular de fungos (GOHEL et al., 2006; SZABÓ et al., 2012; BRZEZINSKA et al., 2014).

Ainda há poucos estudos relacionando temperatura e a produção da quitinase bacteriana, porém sabe-se que em temperaturas que não são ideais para a bactéria, o investimento energético fica reservado para suas funções basais. Outra hipótese para o resultado negativo observado para DFs348, na temperatura de 17°C, pode ser atribuída à atividade da quitinase, pois Hjort et al. (2014), trabalhando com a enzima quitinase bacteriana purificada, determinou a temperatura de 35°C como ótima para sua atividade, com aproximadamente 50% de redução da atividade relativa na temperatura de 15°C.

A proteólise também tem sido considerada importante no controle biológico de fungos (DUNNE et al., 2000) e até mesmo de nematoides (KHAN et al., 2005; SAHEBANI; HADAVI, 2008). Padgham e Sikora (2007) associaram a atuação dessas enzimas sobre membranas de ovos e da cutícula de formas móveis de diferentes espécies de nematoides. Abordagens transcriptômicas mostraram que a interação entre o ataque de *Trichodema harzianum* contra o fungo *Sclerotinia*

sclerotiorum envolve a produção de metabólitos secundários e uma modulação principalmente de enzimas hidrolíticas após o contato entre eles (STEINDORFF et al., 2014). Portanto, a capacidade de produção de enzimas hidrolíticas, como as caseinases e lipases, pelos isolados DFs093, DFs348, DFs513, DFs769, DFs831 e DFs842 em diferentes condições de temperatura podem auxiliar na degradação da parede de fitopatógenos antes mesmo de haver condições ideais para o desenvolvimento destes.

Outra maneira de sobressair entre os microrganismos é através da produção de sideróforos. Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular, quelante de íons férricos, o que resulta na solubilização do ferro presente no solo, e está associado tanto ao controle biológico quanto à promoção do crescimento de plantas (BURD; DIXON; GLICK, 2000; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; BENÍTEZ et al., 2004; AHMAD; AHMAD; KHAN, 2008; DIMKPA et al., 2008). Naureen e colaboradores (2015) estudaram diferentes metabólitos produzidos por isolados bacterianos antagônicos contra o patógeno fúngico *Rhizoctonia solani* correlacionando-os fortemente com a quantidade de sideróforos produzidos, e que este antagonismo foi aumentado em condições de limitação de ferro. Isso ocorre devido ao fato de que baixa disponibilidade de ferro em um ambiente pode se tornar fator limitante para o crescimento e multiplicação, e, neste caso, o microrganismo que for capaz de sequestrar o ferro, indisponibilizando-o para os demais, leva uma grande vantagem competitiva, constituindo assim um importante mecanismo de competição (LIM; LEE; KIM 2002; DUFFY et al., 2003; SZILAGYI-ZECCHIN et al., 2014). Ainda, os sideróforos podem atuar na defesa contra fitopatógenos por meio da indução de resistência em plantas (DUIJFF et al., 1993; VERBON et al., 2017).

A capacidade de produção de sideróforos por bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. já é consagrada (YASMIN et al., 2012; HERNÁNDEZ et al., 2015) e o biocontrole exercido por *Pseudomonas* através de sideróforos têm sido amplamente relatado na literatura. Manwar et al. (2004), consideram que as pioverdinas são responsáveis pelo biocontrole de *Sclerotium rolfsii*. Em outro estudo, a estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* FP6 quando testada para atividade antagonista *in vitro* contra *Rhizoctonia solani* e *Colletotrichum gloeosporioides* em meio com e sem FeCl₃, mostrou redução significativa no controle de *R. solani* com suplementação de Ferro em relação ao controle (sem FeCl₃), sugerindo papel do antagonismo mediado por sideróforo. Já no caso de *C. gloeosporioides*, a atividade

antifúngica não foi influenciada pelo FeCl_3 , indicando a presença de outros mecanismos antagonistas (SASIREKHA; SRIVIDYA, 2016).

No presente estudo, os isolados produtores de sideróforos apresentaram a capacidade de fazê-lo em todas as temperaturas no qual se desenvolveram, semelhante aos resultados encontrados por Landa, Navas-Cortés e Jiménez-Díaz (2004), onde para os isolados de *P. fluorescens*, a produção de sideróforo (pioverdina) ocorreu em todas as temperaturas onde houve crescimento dos isolados, exceto a 37.5°C (quando o crescimento bacteriano diminuiu), e a maior quantidade relativa de pioverdina para os dois isolados ocorreu a 25°C. Isso indica o potencial dos isolados estudados em atuar no controle de fitopatógenos através da competição por nutrientes e/ou indução de resistência dentro da faixa de temperatura de 17 a 32°C.

Compostos voláteis compõem uma parte importante dos mecanismos de ação do controle biológico. A produção de amônia volátil também tem sido implicada como um mecanismo com efeito direto contra fitopatógenos (PAULITZ et al., 2000; MACAGNAN; ROMEIRO; POMELLA, 2009). No presente trabalho, todos os isolados foram capazes de produzir amônia, este produto do metabolismo secundário de bactérias possui grande importância em termos de efeito antagônico (GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015), uma vez que é capaz de penetrar rapidamente nas membranas das células sendo tóxica aos microrganismos (TENUTA et al., 2002). Quanto ao efeito da temperatura no tempo necessário para a produção da amônia, o isolado DFs093 (*Bacillus cereus*) foi o que apresentou maior estabilidade, pois não sofreu influência da temperatura em relação ao período de tempo necessário para detecção da produção de amônia. Os demais isolados do gênero *Bacillus* e do gênero *Pseudomonas* apresentaram pouca variação no período de incubação necessário para detecção da produção de amônia. Os isolados do gênero *Rhodococcus* também apresentaram pequena variação no período de tempo de incubação para a detecção de amônia, porém estes isolados necessitaram de maior tempo de incubação. Isso pode ser justificado pelo fato de que bactérias pertencentes a este gênero têm período de geração (crescimento) mais lento do que os demais gêneros estudados (HOLT, 1994), como visto no ensaio de crescimento quantitativo.

Outro ponto a se considerar é que, na maioria dos casos, o atraso no tempo necessário a produção da amônia na temperatura de 17°C, está relacionado com

menores absorvâncias no ensaio do crescimento quantitativo nesta temperatura, indicando um possível efeito do tamanho da população bacteriana. Vários fatores aqui estudados estão relacionados com a densidade populacional, pois as bactérias podem utilizar moléculas de sinalização específicas (autoindutoras) para se comunicar com populações circundantes (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994). Estas vias de sinalização são amplamente utilizadas para regular e coordenar suas interações em evento conhecido como quorum sensing (QS), e está envolvido em vários processos biológicos, tais como a movimentação swarming, produção de metabólitos secundários, transferência de genes, colonização, maturação de biofilmes e síntese de fatores de virulência (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994; VON BODMAN; BAUER; COPLIN, 2003).

No presente trabalho foi verificada redução significativa do crescimento micelial de CL por meio dos compostos voláteis produzidos por todos os isolados biocontroladores. Esta redução pode ter sido proporcionada pela produção da amônia e/ou de outros compostos. Pesquisas indicam que voláteis liberados por bactérias desempenham um papel importante nas múltiplas interações microbianas, uma vez que elas podem liberar uma grande variedade de compostos, dos quais alguns são capazes de alterar processos fisiológicos em outras bactérias e fungos (AUDRAIN et al., 2015; SCHMIDT et al., 2015). Nos fungos, estes compostos podem atravessar a parede celular e induzir alterações na permeabilidade da membrana plasmática (LI et al., 2012). Em um estudo realizado por CHEN e colaboradores (2008), *Bacillus subtilis* foi capaz de produzir substâncias voláteis com atividade antifúngica, ocasionando retração do protoplasma das extremidades de hifas de *Botrytis cinerea*, neste mesmo trabalho foram encontrados 14 compostos voláteis de *B. subtilis* com potencial de interferir na atividade microbiana, identificados por meio de cromatografia gasosa de espectro de massa.

Ainda para a antibiose por meio de compostos voláteis, somente na temperatura de 17°C a redução do tamanho da colônia do fungo pelo isolado DFs912 não foi significativa em comparação com a testemunha, o que pode estar relacionado com a quantidade de amônia produzida por este isolado, pois como pode ser visto na Tab.3, nesta temperatura é necessário maior período de tempo para detecção da produção da amônia pelos isolados do gênero *Rhodococcus*.

No biocontrole *in vitro* por pareamento, os resultados mostram o efeito antagônico de todos os isolados biocontroladores, exceto DFs843, exercido sobre o

fungo CL. No pareamento, não houve contato direto entre o fungo e isolado biocontrolador, estabelecendo-se que a antibiose foi alcançada por meio de compostos difundidos no meio de cultura. Dentre estes compostos, a produção de antibióticos por bactérias biocontroladoras é conhecida por restringir o crescimento de patógenos (KINSELLA et al., 2009). Para o isolado DFs912, somente na temperatura de 17°C não houve diferenças significativas do crescimento fúngico quando comparados com a testemunha. Isso pode ser explicado pelo fato de que nessa temperatura o crescimento bacteriano é retardado, e pode haver a possibilidade de que nela a produção de antibióticos não ocorra ou seja menor, pois a temperatura é um dos fatores físicos relatados que afeta a produção de antibióticos (SHANAHAN et al., 1992).

Nos ensaios *in vivo*, para a antracnose, os isolados de *Bacillus* e de *Pseudomonas* foram os que apresentaram maior redução da severidade calculada através da AACPD, que independente da temperatura, reduziram a severidade em média de 48%. Neste estudo, todos os isolados estudados diminuíram significativamente a AACPS de CBC, dando destaque para DFs831, DFs842, DFs093, DFs513, que controlaram a doença em 33%.

Diversas estirpes de *Bacillus* spp. são conhecidas por serem potentes agentes de biocontrole, muitas delas eficazes no controle biológico da murcha bacteriana, murcha de *Fusarium*, podridão da raiz por *Rhizoctonia* e *Pythium*, dentre outras doenças (CHEN et al 2014; GONZALEZ-SANCHEZ et al., 2013; YAMAMOTO et al., 2014). Os mecanismos de controle biológico envolvidos incluem a produção de antibióticos, sideróforos, e cianeto de hidrogênio; competição por nutrientes e espaço na rizosfera; resistência induzida; e inativação das enzimas do agente patogênico (CHOUDHARY; JOHRI, 2009; RADDADI et al., 2007). Além disso, biocontroladores do gênero *Bacillus* spp. são adequados para comercialização porque produzem esporos e são resistentes ao calor e à dessecação, podendo ser prontamente formulado em produtos estáveis (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Biocontroladores do gênero *Pseudomonas* spp. também são muito estudados, pois a produção de uma variedade de metabolitos secundários, incluindo antibióticos como diacetilfloroglucinol (DAPG), diferentes tipos de fenazinas, dentre outros, bem como a capacidade de indução de resistência em plantas têm mostrado estarem envolvidos na redução de várias doenças causadas por fungos e bactérias. Ainda, a alta capacidade de colonização do solo, bem como a competitividade das

Pseudomonas spp. revelam o potencial para o seu uso em aplicações comerciais (ARSENEAULT; FILION, 2016; MUNHOZ et al., 2017). A aplicação de *Pseudomonas fluorescens* na parte aérea da planta por pulverização também mostrou destaque entre outros métodos de aplicação de biocontroladores no controle de *Botrytis cinerea* (KHAN et al, 2011). Nesse mesmo sentido, em um estudo de campo conduzido por Netam e colaboradores (2016), foi demonstrada a eficácia da combinação de pulverizações de bioagentes (dentre eles *P. fluorescens*) em milho para controlar a mancha foliar causada por *Pyricularia grisea*. Portanto, vale ressaltar que a pulverização de biocontroladores pode ter um efeito aditivo no controle de doenças, complementando as outras formas de aplicação como a microbiolização e inundação do solo (MANIKANDAN; RAGUCHANDER, 2014).

Quanto a metodologia utilizada, Pereira e colaboradores (2014), estudaram a possibilidade de se efetuar seleção de plantas de feijoeiro resistentes à antracnose utilizando-se folhas primárias destacadas em ambiente parcialmente controlado e, comparando com a metodologia tradicionalmente utilizada, as duas metodologias proporcionaram resultados semelhantes quanto à reação apresentada pelos cultivares, evidenciando que a utilização de folhas destacadas de feijoeiro em ambiente parcialmente controlado é viável para a seleção quanto à resistência à antracnose. Bigirimana e Hofte (2001), analisaram três metodologias diferentes para inoculação de *C. lindemuthianum* em feijão: Inoculação em sementes germinadas, em plântulas e em folhas destacadas; e, embora os métodos tenham dado resultados semelhantes, a inoculação de folhas destacadas foi o melhor método, por ser a forma mais rápida e prática para investigar a reação da planta frente ao patógeno.

A redução da severidade da antracnose pelos isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas*, assim como a redução da severidade do CBC pelos mesmos isolados, juntamente com os de *Rhodococcus*, pode ter ocorrido por meio da produção de compostos antagônicos voláteis ou não, pela competição por nutrientes e espaço, por parasitismo, pela combinação de mais de um destes mecanismos, ou ainda por mecanismos que não foram estudados.

O fato dos isolados manterem a eficiência de controle com a mudança da temperatura nas médias de severidade é uma característica interessante para o controle biológico, pois indica que eles apresentarão certa estabilidade mesmo quando houver flutuação térmica.

Uma hipótese para o aumento da severidade da antracnose e do CBC quando os tratamentos foram submetidos 37°C, seria pela menor população bacteriana na maioria dos tratamentos, pois durante as 48 horas de incubação nesta temperatura, a multiplicação das células bacterianas não estaria ocorrendo (exceto as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*), como visto no ensaio de crescimento quantitativo. No mesmo sentido, estudos sobre o impacto da temperatura na fisiologia de *Lysobacter capsici* AZ78, sobre a eficácia de biocontrole de *Phytophthora infestans* e a taxa de colonização da filosfera de tomate, mostram que AZ78 coloniza efetivamente as folhas de tomate e controla infestações de *P. infestans* quando as plantas tratadas são incubadas a 15 e 25°C por 24 horas. No entanto, a incubação a 35°C reduz drasticamente a persistência das células bacterianas vivas nas folhas de tomate, bem como o biocontrole do patógeno na planta, neste estudo, a redução da eficácia de biocontrole a 35°C foi associada à antibiose e a atividade proteolítica que também foi prejudicada *in vitro* na mesma temperatura (PUOPOLO et al., 2015). Efeito negativo de elevadas temperaturas no biocontrole também foi demonstrado por Mukherjee e Raghu (1997), onde em cultivo pareado *in vitro*, *Trichoderma* sp. sobressaiu sobre *Sclerotium rolfsii* a 25 e 30°C, mas a 35 e 37°C, *S. rolfsii* sobrepôs a colônia de *Trichoderma*, e em bioensaios usando fatias de gengibre e rizomas inteiros, demonstraram que *Trichoderma* não foi eficaz na supressão *S. rolfsii* em temperaturas acima de 30°C.

Outra hipótese para as maiores médias de severidade nas temperaturas mais elevadas seria porque a alta temperatura ocasiona estresse às folhas destacadas do feijão e, apesar de não terem sido feitas análises fisiológicas, observou-se que as folhas submetidas às temperaturas de 37 e 32°C estavam mais flácidas no momento da inoculação do patógeno.

Os isolados estudados mostraram capacidade de produzir um arsenal diversificado de compostos relacionados ao biocontrole, bem como potencial para controle de mais de uma doença em diferentes temperaturas, indicando que são fortes candidatos ao controle biológico de doenças que acometem a cultura do feijão. Estudos como este são necessários para compreender o que acontece com os biocontroladores na natureza, bem como para selecionar microrganismos que apresentem estabilidade na sua função mesmo sob diferentes condições de ambiente, onde ocorre diariamente variações térmicas.

No entanto, ainda são várias as questões a serem esclarecidas visando à obtenção de um produto comercial de controle biológico, por exemplo, a eficácia do controle destes isolados quando utilizados em condições de campo, a inserção dos biocontroladores no manejo integrado de pragas por meio da compatibilidade com outros defensivos agrícolas utilizados rotineiramente na cultura, bem como estudos de formulação e viabilidade em condições de armazenagem. Por fim, seria interessante também, avaliar o efeito complementar ou sinérgico de métodos de aplicação de biocontroladores, tais como, microbiolização e pulverização, visando o aumento do espectro e da eficácia.

6. CONCLUSÕES

A temperatura interfere na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas por bactérias biocontroladoras.

A temperatura pode interferir na velocidade da produção de compostos antimicrobianos.

As bactérias estudadas produzem compostos antimicrobianos voláteis ou não contra *Colletotrichum lindemuthianum in vitro*.

A pulverização preventiva com os isolados de *Bacillus* (DFs093, DFs348 e DFs769) e *Pseudomonas* (DFs513, DFs831 e DFs842,) em folhas de feijão, reduzem a severidade da antracnose.

A pulverização preventiva com os isolados de *Bacillus* (DFs093, DFs348 e DFs769), *Pseudomonas* (DFs513, DFs831 e DFs842) e *Rhodococcus* (DFs843 e DFs912), em folhas de feijão, reduzem a severidade do crestamento bacteriano comum.

A temperatura interfere nos níveis de doença da antracnose e do crestamento bacteriano comum.

7. REFERÊNCIAS

- ABEE, T.; WOUTERS, J.A. Microbial stress response in minimal processing. **International Journal in Food Microbiology**, v.50, p.65–91, 1999.
- ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.M.A.P.; BEN OMAR, N.; GALVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. **FEMS Microbiology Reviews**, v.35, p.201–232, 2011.
- AGROFIT: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 13/07/2016.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v.163, p.173-181, 2008.
- ANACKER, L.F. **Controle biológico do cretamento bacteriano comum e da antracnose em folhas de feijão pela pulverização de bactérias**. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.
- ARSENEAULT, T.; FILION, M. Phenazine-Producing *Pseudomonas* spp. as Biocontrol Agents of Plant Pathogens. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, v.2, p 53-68, 2016.
- ASHRAFUZZAMAN, M.; HOSSEN, F. A.; ISMAIL, M. R.; HOQUE, M. D. A.; ISLAM, M. Z.; SHAHIDULLAH, S. M.; MEON, S. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1247-1252, 2009.
- AUDRAIN,B.; FARAG, M.A.; RYU, C.M.; GHIGO,J.M. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v.39, p.222–233, 2015.
- BABALOLA, O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v.32, p.1559–1570, 2010.
- BACH, E.; SEGER, G.D.S.; FERNANDES, G.C.; LISBOA, B.B.; PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria, **Applied Soil Ecology**, v.99, p.141–149, 2016.

BARBOSA, F. R.; GONZAGA, A. C. O. Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na Região Central-Brasileira: 2012-2014. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão. **Documentos / Embrapa Arroz e Feijão**, 2012. 247 p.

BENÍTEZ, T.; RICÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. **International Microbiology**, v.7, p.249-260, 2004.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, 7, 1673–1685, 2005.

BERMÚDEZ, J.M.M. **Potencial de controle da antracnose em feijão com bactérias e metabólitos em pulverização foliar**. 2016, 61f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Impactos das mudanças climáticas sobre o controle biológico de doenças de plantas. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2009. p.29-48.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. **Doenças do feijoeiro**. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres: 3 ed, v. 2, 1997. p.376-399.

BIGIRIMANA, J.; HOFTE, M. Bean Anthracnose: Inoculation Methods and Influence of Plant Stage on Resistance of *Phaseolus vulgaris* Cultivars. **Journal of Phytopathology**, v.149, p.403-408, 2001.

BLOEMBERG, G.V.; LUGTENBERG, B.J.J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, n.4, p.343-350, 2001.

BLUM, L.E.B.; AMARANTE, C.V.T.; ARIOLI, C.J.; GUIMARÃES, L.S.; DEZANET, A.; HACK NETO, P.; SCHEIDT, F.R. Reação de genótipos de *Phaseolus vulgaris* à podridão do colo e ao oídio. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.096-100, 2003.

BOECHAT, L. T.; PINTO, F. A. C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; QUEIROZ, D. M.; TEIXEIRA, H. Detecção do mofobranco no feijoeiro, utilizando características espectrais. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n.6, p.907-915, 2014.

BRADLEY, B. A., BLUMENTHAL, D. M., EARLY, R., GROSHOLZ, E. D., LAWLER, J. J., MILLER, L. P.; SORTE, C.J.B.; D'ANTONIO, C.M.; DIEZ, J.M.; DUKES, J.S.; IBANEZ, I.; OLDEN, J.D. Global change, global trade, and the next wave of plant invasions. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v.10, n.1, p.20-28, 2012.

BROUGHTON, W.J.; HERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus spp.*) – model food legumes. **Plant Soil**, v.252, p.55–128, 2003.

BRZEZINSKA, M.S.; JANKIEWICZ, U.; BURKOWSKA, A.; WALCZAK, M. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. **Current Microbiology**, v.68, p.71-81, 2014.

BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.237-245, 2000.

CAMPBELL, C.L.; MADDEN, L.V. (Ed.). Introduction to plant disease epidemiology. New York, NY: Wiley, 1990. 532p.

CARVALHO, J. J.; SAAD, J. C. C.; BASTOS, A. L. V. S.; NAVES, S. S.; SOARES, F. A. L.; VIDAL, V. M. Teor e acúmulo de nutrientes em grãos de feijão comum em semeadura direta, sob déficit hídrico. **Irriga**, Edição Especial 01, p. 104-117, 2014.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Documentos 139).

CHAIHARN, M.; CHUNHALEUCHANON, S.; LUMYONG, S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v.25, p.1919-28, 2009.

CHAKRABORTY, S. Effects of climate change. In: WALLER, J. M. L.; WALLER, S. J. (Ed.). **Plant pathologist's pocketbook**. Wallingford: CAB International, 2001. p.203-207.

CHAKRABORTY, S.; TIEDEMANN, A. V.; TENG, P. S. Climate change: potential impact on plant diseases. **Environmental Pollution**, v.108, p.317- 326, 2000.

CHEN D.; LIU X.; LI, C.; TIAN, W.; SHEN, Q.; SHEN, B. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt. **Journal Environmental Management**, v.137, p.120–127, 2014.

CHEN, H.; XIAO, X.; WANG, J.; WU, L.; ZHENG, Z.; YU, Z. Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. **Biotechnology Letters**, v.30, p.919–923, 2008.

CHIORATO, A.F.; CARBONELL, S.A.M.; BOSETTI, F.; SASSERON, G.R.; LOPES, R.L.T.; AZEVEDO, C.V.G. Common bean genotypes for agronomic and market-related traits in VCU trials. **Scientia Agricola**, v.72, p.34-40, 2015.

CHOUDHARY, D.K.; JOHRI, B.N. Interactions of *Bacillus spp.* and plants - with special reference to induced systemic resistance (ISR). **Microbiological Research**, v.164, p.493–513, 2009.

CHOWDHURY, S.P.; HARTMANN, A.; GAO, X.; BORRIS, R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.780, 2015.

COMISSÃO ESTADUAL DE PESQUISA DE FEIJÃO (CEPEF): **recomendações técnicas para cultivo no Rio Grande do Sul**. Santa Maria: UFSM, 2000. 80 p.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLEMENT, C.; BARKA, E.A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.4951–4959, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Conab. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_06_08_09_02_48_boletim_gaos_junho_2017.pdf > Acesso em 12 de junho de 2017.

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.D.; 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 nematoide das galhas, **Nematropica**, v.42, n.2, 2012.

CORRÊA, B.O.; SCHAFER, 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.

D'AES, J.; KIEU, N.P.; LÉCLÈRE, V.; TOKARSKI, C.; OLORUNLEKE, F.E.; MAEYER, K.D.; JACQUES, P.; HÖFTE, M.; ONGENA, M. To settle or to move? The interplay between two classes of cyclic lipopeptides in the biocontrol strain *Pseudomonas* CMR12a. **Environmental Microbiology**, v.16, n.7, p.2282–2300, 2014.

DALLA PRIA, M.; AMORIM, L.; FILHO, A.B. Quantificação de componentes monocíclicos da antracnose do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.401-407, 2003.

DALLA PRIA, M.; SILVA, O. C. da.; COSTA, J. L. da S.; SOUZA, E. D. de T.; BERNI, R. F. Diagnóstico das doenças. In: CANTERI, M. G., M.; SILVA, O. C. da. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**. Ponta Grossa: UEPG, 1999. p. 17-34.

DE LA FUENTE, M.; VIDAL, J.M.; MIRANDA, C.D.; GONZALEZ, G.; URRUTIA, H. Inhibition of *Flavobacterium psychrophilum* biofilm formation using a biofilm of the antagonist *Pseudomonas fluorescens* FF48. **Springer Plus**, v.2, n.176, 2013.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1995. 448p.

DIAZ, C.G.; BASSANEZI, R.B.; GODOY, C.V.; LOPES, D.B.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação do efeito do cretamento bacteriano comum na eficiência fotossintética e na produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, n.1, p.71-76, 2001.

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

DILLARD, H.R.; COBB, A.C. Survival of *Colletotrichum lindemuthianum* in bean debris in New York State. **Plant Disease**, v. 77, p. 1233-1238, 1993.

DIMKPA, C.O.; SVATOS, A.; DABROWSKA, P.; SCHMIDT, A.; BOLAND, W.; KOTHE, E. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. **Chemosphere**, v.74, p.19-25, 2008.

DUFFY, B.; KEEL, C.; DÉFAGO, G. Potential role of pathogen signaling in multitrophic plant-microbe interactions involved in disease protection. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n.3, p. 1836-1842, 2004.

DUFFY, B.; SCHOUTEN, A.; RAAIJMAKERS, J.M. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. **Annual Review of Phytopathology**, v.41, p.501-538, 2003.

DUIJFF, B.J.; MEIJER, J.W.; BAKKER, P.A.H.M.; SCHIPPERS, B. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, v.99, p.277-289, 1993.

DUNNE, C.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; BRUIJN, F.J.; O'GARA, F. Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81, **Microbiology**, v.146, p.2069–2078, 2000.

ELIAS, H.T.; GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; GONELA, A.; VOGT, G.A. Variabilidade genética em germoplasma tradicional de feijão-preto em Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.143-149, 2007.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. **Produção de feijão**. São Paulo: Editora USP, 2007. 56 p.

FERREIRA, J. J.; CAMPA, A. P. E.; GIRALDEZ, R. Reaction of a bean germplasm collection against five races of *Colletotrichum lindemuthianum* identified in Northern Spain and implications for breeding. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 92, p. 705–708, 2008.

FREE, S.J. Fungal cell wall organization and biosynthesis. **Advances in Genetics**, v.81, p.33–82, 2013.

FUQUA, W.C.; WINANS, S.C.; GREENBERG, E.P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.269–275, 1994.

GACITÚA S.A.; VALIENTE C. F.; DÍAZ K.P.; HERNÁNDEZ J.C.; URIBE M.M.; SANFENTES, E.V. Identification and biological characterization of isolates with activity inhibitive against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. **Chilean journal of agricultural research**, v.69, n.4, p.526-533, 2009.

GARCIA, A.; DE SOUZA, P.E.; POZZA, E.A.; SANTOS, F.S. Influencia das variáveis ambientais no progresso da antracnose do feijoeiro e eficiência de tiofanato metílico + clorotalonil no controle da doença. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 6, p. 1709-1715, nov./dez. 2007.

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

GARCIA, T.V.; KNAAK, N.; FIUZA, L.M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.82, p.1-9, 2015.

GILLARD, C.L.; CONNER, R.L.; HOWARD, R.J.; PAULS, K.P.; SHAW, L.; TARAN, B. The performance of dry bean cultivars with and without common bacterial blight resistance in field studies across Canada. **Canadian Journal of Plant Science**, v.89, p.405-416, 2009.

GOHEL, V.; SINGH, A.; VIMAL, M.; ASHWINI, P.; CHHATPAR, H.S. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. **African Journal Biotechnology**, v.5 p.54-72, 2006.

GOLDSON, S. L. Special example 2: climate change and biological control. In: NEWTON, P.C.D.; CARRAN, R. A.; EDWARDS, G.R.; NIKLAUS, P. A. (Eds.) **Agroecosystems in a changing climate**. Boca Raton, CRC Press, 2007, p.329-332.

GONÇALVES-VIDIGAL, M.C.; THOMAZELLA, C.; VIDIGAL FILHO, P.S.; KVITSCHAL, M.V.; ELIAS, H.T. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum*

isolates using differential cultivars of common bean in Santa Catarina state, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, p. 883-888, 2008.

GONZALEZ-SANCHEZ, M.A.; DE VICENTE, A.; PEREZ-GARCIA, A.; PEREZ-JIMENEZ, R.; ROMERO, D.; CAZORLA, F.M. Evaluation of the effectiveness of biocontrol bacteria against avocado white root rot occurring under commercial greenhouse plant production conditions. **Biological Control**, v.67, p.94–100, 2013.

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.

GURR, S.; SAMALOVA, M.; FISHER, M. The rise and rise of emerging infectious fungi challenges food security and ecosystem health. **Fungal Biology Reviews**, v.25, p.181–188, 2011.

HALL, R. Compendium of bean diseases. St Paul: The American Phytopathological Society Press, 1991, 71p.

HANKE, A., BERG, J., HARGESHEIMER, T., TEGETMEYER, H.E., SHARP, C.E.; STROUS, M. Selective pressure of communities. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.1461, 2015.

HARMAN, G.E.; HOWELL, C.R.; VITERBO, A.; CHET, I.; LORITO, M. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p.43-56, 2004.

HARSHEY, R. M.; Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. **Annual Review Microbiology**. v.57, p. 249–273, 2003.

HERNÁNDEZ-LEÓN R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M.D.C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; REYES, H.C.L; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v.81, p.83-92, 2015.

HJORT, K.; PRESTI, I.; ELVÄNG, A.; MARINELLI, F.; SJÖLING, S. Bacterial chitinase with phytopathogen control capacity from suppressive soil revealed by functional metagenomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.2819–2828, 2014.

HOLT, J.G.. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ed. Baltimore : Williams & Wilkins, 1994, 787 p.

HOWELL, C.R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant Disease**, v.87, n.1 p.4-10, 2003.

INOUE, T.; SHINGAKI, R.; HIROSE, S.; WAKI, K.; MORI, H.; FUKUI, K. Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12.J. **Journal of Bacteriology**, v.189, p.950-957, 2007.

ITO T. Enzymatic determination of itoic acid, a *Bacillus subtilis* siderophore, and 2,3-dihydroxybenzoic acid, **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.7, p.2343-45, 1993.

JI, S. H.; PAUL, N. C.; DENG, J. X.; KIM, Y. S.; YUN, B. S.; YU, S. H. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. **Mycobiology**, v. 41, n. 4, p. 234-242, 2013.

KATO, K.; WATANABE, K.; ARIMA, Y. *Rhizobium* proliferation-supporting substances in seed Exudates of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 51, n. 6, p. 905-910, 2005.

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Review Microbiology**. v. 8, n. 9, p.634–644, 2010.

KHAN, A.; WILLIAMS, K. L.; NEVALAINEN, H. K. M. Effects of *Paecilomyces lilacinus* protease and chitinase on the eggshell structures and hatching of *Melodogyne javanica* juveniles. **Biological control**, v. 31, p. 346-352, 2005.

KHAN, M.R.; ANWER, M.A.; SHAHID,S. Management of gray mold of chickpea, *Botrytis cinerea* with bacterial and fungal biopesticides using different modes of inoculation and application. **Biological Control**, v.57, p.13–23, 2011.

KHEM, R.M.; SAMSHER, S.K. Lipopeptides as the antifungal and antibacterial agents. application in food safety therapeutic. **Biomedical Research International**. p.1-9 , 2015.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. **Manual de fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. Vol.2, São Paulo: Editora Ceres, 2005. 275-653p.

KIMATI, H. Doenças do feijoeiro – *Phaseolus vulgaris*. In: GALLI, F (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**. São Paulo:Ceres, v. 2, p.297- 318, 1980.

KINSELLA, K., SCHULTHESS, C.P., MORRIS, T.F.; STUART, J.D. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. **Soil Biology and Biochemistry**, v.41, p.374-379, 2009

KÖHL, J.; POSTMA, J.; NICOT, P.; RUOCCO, M.; BLUM, B. Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant pathogenic fungi and bacteria. **Biological Control**, v.57, p.1–12, 2011.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; DEVI, H.; PATIL, S.; PAYAL, C.; NEGI, S. Isolation, screening and characterization of bacteria from rhizospheric soils for different plant

growth promotion (PGP) activities: an *in vitro* study. **Recent Research in Science and Technology**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2012.

LAI, S.; TREMBLAY, J.; DÉZIEL, E. Swarming motility: a multicellular behavior conferring antimicrobial resistance. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 126–136, 2009.

LANDA, B.B.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. Influence of temperature on plant–rhizobacteria interactions related to biocontrol potential for suppression of *fusarium* wilt of chickpea, **Plant Pathology**, v.53, p.341–352, 2004.

LI, Q.; NING, P.; ZHENG, L.; HUANG, J.; GUOQING, L.; HSIANG, T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. **Biological Control**, v.61, p.113-120, 2012.

LIM, H. S.; LEE, J.M.; KIM, S.D. A Plant Growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* GL20: mechanism for disease suppression, outer membrane receptors for ferric siderophore, and genetic improvement for increased biocontrol efficacy. **Journal of Microbiology and Biotechnololy**, v.12, n.2, p.249–257, 2002.

LOPES, E.A.G.L. **Controle biológico de *Botrytis cinerea* in vitro em mudas de *Eucalyptus* sp.** 2001. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO R.S.; POMELLA, A.W.V. Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis pernicioso* por compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos residentes de filoplano de cacaueteiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.140-142, 2009.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M., PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10.ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608p.

MANIKANDAN,R.; RAGUCHANDER,T. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* retardation through induction of defensive response in tomato plants using a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* (Pf1). **European Journal Plant Pathology**, v.140, p.469–480, 2014.

MANWAR, A.V.; KHANDELWAL, S.R.; CHAUDHARI, B.L.; MEYER, J.M.; CHINCHOLKAR, S.B. Siderophore production by a marine *Pseudomonas aeruginosa* and its antagonistic action against phytopathogenic fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.118, p.243-251, 2004.

MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2 ed. Recife: UFRPE, 2005.184p.

MARINGONI, A.C.; LAURETTI, R.L.B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.4, p.535-532, 1999.

MATHUR, R.S.; BARNETT, H.L.; LILLY, V.G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, v.40, p.104-114, 1950.

MATYSSEK, R.; WIESER, G.; CALFAPIETRA, C.; DEVRIES, W.; DIZENGREMEL, P.; ERNST, D. Forests under climate change and air pollution: gaps in understanding and future directions for research. **Environmental Pollution**, v.160, p.57–65, 2012.

McCARTER, L.L. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. **Microbiology and Molecular Biology Review**, v. 65, p.445–462, 2001.

MORA, I.; CABREFIGA, J.; MONTESINOS, E. Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. **PLoS ONE**, v.10, n.5, 2015.

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

MUKHERJEE, P.K.; RAGHU, K. Effect of temperature on antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma* sp. on *Sclerotium rolfsii* Prasun, **Mycopathologia**, v.139, p.151–155, 1997.

MUNHOZ, L.D.; FONTEQUE, J.P.; SANTOS, I.M.O.; NAVARRO, M.O.P.; SIMIONATO, A.S.; GOYA, E.T.; REZENDE, M.I.; BALBI-PEÑA, M.I.; DE OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE, G. Control of bacterial stem rot on tomato by extracellular bioactive compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain, **Cogent Food & Agriculture**, v.3, p.1-6, 2017.

NASEBY, D.C.; PASCUAL, J.A.; LYNCH, J.M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* population, soil microbial communities and soil enzyme activities. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.161-169, 2000.

NAUREEN, Z.; HAFEEZ, F.Y.; HUSSAIN, J.; HARRASI, A.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.03, p.186-207, 2015.

NEERAJA, C.; ANIL, K.; PURUSHOTHAM, P.; SUMA, K.; SARMA, P.; MOERSCHBACHER, B.M.; PODILE, A.R. Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants, **Critical Reviews in Biotechnology**, v.30, n.3, p.231–241, 2010.

NETAM, R.S.; TIWARI, R.K.S.; BAHADUR, A.N.; KUMAR, P.; YADAV, S.C. Efficacy of bio-control agents for the management of (*Pyricularia grisea*) blast disease of finger millet under field condition of Bastar, Chhattisgarh. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v.10, n.3, p. 2421, 2016.

NIHORIMBERE, V.; FICKERS, P.; THONART, P.; THONART, P.; ONGENA, M. Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere. **Environmental Microbiology Reports**, v. 1, n. 2, p. 124-130, 2009.

O'MAY, C., TUFENKJI, N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, p.3061-3067, 2011.

PADGHAM, J.L.; SIKORA, J.L. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. **Crop Protection**, v.26, p.971-977, 2007.

PANDIN, C.; LE COQ, D.; CANETTE, A.; AYMERICH, S.; BRIANDET, R. Should the biofilm mode of life be taken into consideration for microbial biocontrol agents?, **Microbial Biotechnology**, minireview, 2017.

PARRELLA, N.N.L.D.; SANTOS, J.B. dos; PARRELLA, R.A. da C. Seleção de famílias de feijão com resistência à antracnose, produtividade e tipo de grão carioca. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p.1503-1509, 2008.

PAULITZ, T.; THOMPSON, B.N.; GAMARD, P.; TSANG, E.; LOPER, J. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biocontrol agent of fungal plant pathogens. **Journa of Chemical Ecology**, v.26, p.1515-1524, 2000.

PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. In: **Microbiologia**: conceitos e aplicações. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v.1, 524p.

PEREZ-GARCIA A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of bacilli in agriculture. **Current Opinion Biotechnology**, v.22, p.187–193, 2011.

PEREIRA, A.C.; PAULA, R.G.D.; PAULA JÚNIOR, T.J.D.; SILVA, L.C.D.; CARNEIRO, J.E.D.S.; CARNEIRO, P.C.S. Selection of anthracnose resistant common beans using detached leaves in partially controlled environment, **Revista Ceres**, v.61, n.4, p.518-522, 2014.

PERIAGO, P.M.; SCHAİK, W.V.; ABEE, T.; WOUTERS, J.A. Identification of proteins involved in the heat stress response of *Bacillus cereus* ATCC 14579. **Applied And Environmental Microbiology**, v.68, n.7, p.3486–3495, 2002.

POPOVIC, T.; STAROVIC, M.; ALEKSIC, G.; ZIVKOVIC. S.; JOSIC, D.; IGNJATOV, M.; MILOVANOVIC, P. Response of different beans against common bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*. **Bulgarian Journal Agricultural Science**, v.18, n.5, p.701-707, 2012.

PUOPOLO, G.; JOURDAN, E.; ONGENA, M.; PERTOT, I. Insights on the role played by temperature on the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* strain S499. **Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens IOBC-WPRS Bulletin**, v. 86, p.45-48, 2013.

PUOPOLO, G.; PALMIERI, M.C.; GIOVANNINI, O.; PERTOT, I. Impact of temperature on the survival and the biocontrol efficacy of *Lysobacter capsici* AZ78 against *Phytophthora infestans*, **BioControl**, v.60, n.5, 2015.

RADDADI, N.; CHERIF, A.; OLIZARI, H.; MARZORATI, M.; BRUSETTI, L.; BOUDABOUS, A.; Daffonchio, D. *Bacillus thuringiensis* beyond insect biocontrol: plant growth promotion and biosafety of polyvalent strains. **Annals of Microbiology**, v.57, p.481–494, 2007.

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

RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília, DF: Embrapa, 1994. p.217-242.

RAZA, W.; LING, N.; YANG, L.; HUANG, Q.; SHEN, Q. Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9. **Nature**, Scientific Reports 6, n.24856, p.1-13, 2016.

REY, M.S.; BALARDIN, R.S.; PIEROBOM, C.R. Reação de cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*) a patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 1, p.113-116, 2005.

ROCHA, D. J. A.; MOURA, A. B. Controle biológico da murcha do tomateiro causada por *Ralstonia solanacearum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.5, p.423-430, 2013.

RODRÍGUEZ DE LUQUE J.J.; CREAMER, B. Major constraints and trends for common bean production and commercialization: Establishing priorities for future research. **Agronomía Colombiana**, v.32, p.423-431, 2014.

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

SAHEBANI, N.; HADAVI H. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, 2016–2020, 2008.

SANGIOGO, M. **Potencial de controle do crestamento bacteriano comum do feijão com rizobactérias em pulverização foliar**. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

SANTIAGO, L.B.; ALVES, F.S.F.; PINHEIRO, R.R.; DOS SANTOS, V.W.S.; RODRIGUES, A.S.; CHAPAVAL, L.; DE BRITO, I.F.; DE SOUSA, F.G.C. Avaliação *in vitro* da sensibilidade da *Corynebacterium pseudotuberculosis* frente a diferentes tipos de antissépticos e desinfetantes e determinação de sua curva de crescimento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.4, p.593-600, 2010.

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 Fosfato, 1996. p.669-722.

SASIREKHA, B.; SRIVIDYA, S. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. **Agriculture and Natural Resources**, v.50, p.250-256, 2016.

SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.** 3 ed. St. Paul: The American Phytopathology Society, 2001. 373 p.

SCHMIDT, R.; CORDOVEZ, V.; DE BOER, W.; RAAIKMAKERS, J.; GARBEVA, P. Volatile affairs in microbial interactions. **Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology**, v.9, p.2329–2335, 2015.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Annual Biochemical**, v.190, p.47-56, 1987.

SHANAHAN, P.; O'SULLIVAN, D.J.; SIMPSON, P.; GLENNON, J.D.; O'GARA, F. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.353–358, 1992.

SHONNARD, G.C.; GEPTS, P. Genetics of heat tolerance during reproductive development in common bean. **Crop Science**, v.34, p.1168-1175, 1994.

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, n.5, 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, F.C.; SOUZA, R.M. de; ZACARONI, A.B.; LELIS, F.M.V.; FIGUEIRA, A. dos R. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.45-50, 2013.

SILVA, K.J.D.; SOUZA, E.A.; ISHIKAWA, F.H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the State of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v.155, p.241-247, 2007.

SINGH, S.P., SCHWARTZ, H.F. Breeding common bean for resistance to diseases: a review. **Crop Science**, v.50, p.2199–2223, 2010.

SOMAVILLA, L.L.; PRESTES, A.M. Reação de cultivares de feijoeiro a alguns patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p.290-299, 1998.

STEINDORFF, A.S.; RAMADA, M.H.S.; COELHO, A.S.G.; MILLER, R.N.G.; PAPPAS JÚNIOR, G.J.; ULHOA, C.J.; NORONHA, E.F. Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. **BioMed Central Genomics**, v.15, p.204, 2014.

STENGLEIN, S.; PLOPER L.D.; VIZGARRA, O.; BALATTI, P. Angular leaf spot: a disease caused by fungus *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris on *Phaseolus vulgaris* L. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 209-243, 2003.

SZABÓ, M.; CSEPREGI, K.; GÁLBER, M.; VIRÁNYI, F.; FEKETE, C.; Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: the role of chi18-5 and chi18- 12 genes in nematode egg-parasitism. **Biological Control**, v. 63 p. 121–128, 2012.

SZILAGYI-ZECCHIN, V.J.; IKEDA, A.C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L.V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v.4, p.26, 2014.

TENUTA, M.; CONN, K.L.; LAZAROVITS, G. Volatile fatty acids in liquid swine manure can kill microsclerotia of *Verticillium dahliae*. **Phytopathology**, v.92, p.548-552, 2002.

TOILLIER, S.L.; IURKIV, L.; MEINERZ, C.C.; BALDO, M.; VIECELLI, C.A.; KUHN, O.J.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R. Controle de Crestamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnoporus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, p. 99-100. São Paulo. SP. 2010.

TRIVENI, S.; PRASANNA, R.; KUMAR, A.; BIDYARANI, N.; SINGH, R.; SAXENA, A.K. Evaluating the promise of *Trichoderma* and *Anabaena* based biofilms as multifunctional agents in *Macrophomina phaseolina*-infected cotton crop. **Biocontrol Science Technology**, v.25, p.656–670, 2015.

UESUGI, C.H. Bactérias fitopatogênicas, Editora: CopyMarket.com, 2000. 50p.

VERBON, E.H.; TRAPET, P.L.; STRINGLIS, I.A.; KRUIJS, S.; BAKKER, P.A.H.M.; PIETERSE, C.M.J. Iron and Immunity. **Annual Review Phytopathology**, v.55, n.15, p.1-15.21, 2017.

VIEIRA, L.C.; HEMP, S.; NADAL, R. **A cultura do Feijão em Santa Catarina**. Florianópolis: Editora EPAGRI – Empresa de Pesquisa Agropecuária e Difusão Tecnológica de Santa Catarina S.A., 1992. 67p.

VON BODMAN, S.B.; BAUER, W.D.; COPLIN, D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. **Annual Review Phytopathology**, v.41, p.455–482, 2003.

WALLEN, R.V.; GALWAY, A.D. Bacterial blight of field bean. Disease progress, yield loss, and crop canopy development in principal cultivars in Ontário. **Canadian Plant Disease Survey**. v.57, p.61-64, 1977.

WESTCOTT, S.W.; KLUEPFEL, D. Inhibition of *Criconebella xenoplax* egg hatch by *Pseudomonas aureofaciens*. **Phytopathology**, v.83, p.1245-1249, 1993.

WU, Y.; YUAN, J.; RAZA, W.; SHEN, Q.; HUANG, Q. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n.10, p. 1327-1336, 2014.

YAMAMOTO, S.; SHIRAISHI, S.; KAWAGOE, Y.; MOCHIZUKI, M.; SUZUKI, S. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. **Pest Management Science**, v.71, n.5, p.722-727, 2014.

YASMIN, H.; BANO, A.; NAZ, R.; FAROOQ, U.; NOSHEEN, A.; FAHAD, S. Growth promotion by P-solubilizing, siderophore and bacteriocin producing rhizobacteria in *Zea mays* L. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.3, p.553-559, 2012.

YU, C.; CHEN, H.; TIAN, F.; LEACH, J.E.; HE, C. Differentially-expressed genes in rice infected by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* relative to a flagellin-deficient mutant reveal potential functions of flagellin in host–pathogen interactions, **Rice**, v.7, n.20, p.1-11, 2014.

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.; DOS 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.

ZHANG, Z.; YUEN, G.Y.; SARATH, G.; PENHEITER, A.R. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. **Phytopathology**, v.91, p.204–211, 2001.

ZILLI, J.E., RUMJANECK, N.G., XAVIER, G.R., COUTINHO, H.L.C., NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n.3, p. 391-411, 2003.

ZUCARELI, C.; PRANDO, A.M.; RAMOS JUNIOR, E.U.; NAKAGAWA, J. Fósforo na produtividade e qualidade de sementes de feijão Carioca Precoce cultivado no período das águas. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, p.32-38, 2011.