

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade



Dissertação

**Potencial de controle do cretamento bacteriano comum
do feijão com rizobactérias em pulverização foliar**

Maurício Sangiogo

Pelotas, 2015

MAURÍCIO SANGIOGO

**Potencial de controle do cretamento bacteriano comum
do feijão com rizobactérias em pulverização foliar**

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 Bittencourt Moura

Coorientadores: Dr^a. Bianca Obes Corrêa

Dr. Roberto Lanna Filho

Dr. Irajá Ferreira Antunes

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S225p Sangiogo, Mauricio

Potencial de controle do cretamento bacteriano comum do feijão com rizobactérias em pulverização foliar / Mauricio Sangiogo ; Andrea Bittencourt Moura, orientador ; Bianca Obes Corrêa, Roberto Lanna Filho, coorientadores. — Pelotas, 2015.

57 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Xanthomonas axonopodis pv. phaseoli. 2. Controle biológico. 3. Indução de resistência. 4. ISR. 5. Phaseolus vulgaris. I. Moura, Andrea Bittencourt, orient. II. Corrêa, Bianca Obes, coorient. III. Lanna Filho, Roberto, coorient. IV. Título.

CDD : 63635.652

Banca Examinadora

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

Dra. Glaucia de Figueiredo Nachtigal

Dr. Cesar Bauer Gomes

Dr. Ismail Teodoro de Souza Júnior

*Aos meus pais, João Batista e Jacinta Fátima Sangiogo, por me apoiarem sempre,
ao mesmo tempo que me mostraram a importância da dedicação, persistência, e
acima de tudo, da honestidade.*

Dedico.

Agradecimentos

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e por todas as oportunidades por Ele concedidas, permitindo-me realizar essa conquista.

Aos meus pais, João Batista Sangiogo e Jacinta Fátima Sangiogo, por sempre estarem ao meu lado, me apoiarem, e por tudo que me proporcionaram, em especial a educação, me ensinando sempre que a dedicação e trabalho honesto traz bons frutos.

Aos meus irmãos João Batista Sangiogo Junior e Cláudio Luiz Sangiogo, minhas cunhadas Caciana Sangiogo e Aressana Fontana Sangiogo por todo apoio e carinho oferecido.

À minha namorada, Caroline da Cruz Abreu, por todo amor, apoio, compreensão, auxílio, esforço e paciência, mesmo em momentos difíceis.

À minha orientadora Professora Dra. Andrea Bittercourt Moura, pela amizade, apoio, auxílio, compreensão e ensinamentos a mim passados ao longo desse período.

À minha co-orientadora Professora Dra. Bianca Obes Corrêa pela colaboração nos trabalhos, amizade, auxílio e ensinamentos durante a realização desse trabalho.

Ao Professor Dr. Marcos Baccarin por todo o auxílio prestado, disponibilizado a casa de vegetação e laboratório para a realização dos experimentos.

Ao Dr. Demócrito Amorim Chiesa Freitas, pelo auxílio e ensinamentos prestados.

Aos amigos e colegas da Universidade: Renata, Daniela, Johan, Priscila, Fábio, Keilor, Paulo, Fernanda, Cristiano, Felipe, por toda ajuda e amizade ao longo desse período.

Aos estagiários e amigos, Marcelo, Filipe, Sandro e Daniela, pelos auxílios nos trabalhos e experimentos.

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

À Dona Nadia que todos os dias me recepcionava com seu “bom dia” bem humorado e alegre.

À Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel – UFPel, Departamento de Fitossanidade e ao Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade, pela oportunidade de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

E a todos aqueles, que de alguma forma estiveram contribuindo para que tudo isso se tornasse realidade.

Resumo

SANGIOGO, Maurício. **Potencial de controle do crestamento bacteriano comum do feijão com rizobactérias em pulverização foliar.** 2015. 58f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Isolados bacterianos biocontroladores do crestamento bacteriano comum do feijão (CBC), por meio da microbiolização de sementes são conhecidos. No entanto, não se tem conhecimento do comportamento desses isolados aplicados em folhas. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram: i) avaliar o potencial do controle do CBC pela pulverização foliar de bactérias biocontroladoras; ii) avaliar efeito da pulverização dessas bactérias quando aplicadas anterior e posteriormente à inoculação do patógeno; iii) identificar o potencial de isolados de bactérias biocontroladoras em induzir resistência em plantas de feijão ao CBC. Para tanto, foram realizados três ensaios em casa de vegetação. No ensaio I foram realizadas pulverizações com suspensões bacterianas dos seguintes isolados: DFs93, DFs513, DFs769; e duas combinações CO1 (DFs93/DFs769/DFs831) e CO3 (DFs348/DFs769/DFs831), em diferentes momentos de aplicação: 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* - XAP) (AIP) e 24 e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). No ensaio II foram pulverizados os isolados DFs513, DFs769 e a combinação CO3, em 72 e 48 horas AIP e 48 horas PIP. Por fim, no ensaio III, avaliou-se o potencial de indução de resistência ao CBC, por meio da separação espacial entre biocontrolador e patógeno. No último ensaio, foram pulverizadas os isolados DFs513, DFs769 e a combinação CO3, aplicados 72 e 48 horas AIP. As pulverizações foram realizadas em folíolos distintos daqueles onde o patógeno foi inoculado, em dois esquemas: aplicação do biocontrolador nos folíolos laterais e XAP no folíolo apical; biocontrolador no folíolo apical e XAP nos folíolos laterais. Para todos ensaios foram realizadas cinco avaliações de incidência, severidade, e o cálculo da área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS). De maneira geral, DFs769 e CO3 reduziram a AACPI, severidade e AACPS, quando aplicados preventivamente. O isolado DFs769 reduziu a severidade, AACPI e AACPS mesmo quando aplicado em folíolo diferente do patógeno. Dessa forma, os tratamentos DFs769 e CO3 são potenciais biocontroladores do CBC quando aplicados por pulverização foliar, em caráter preventivo. Adicionalmente, o tratamento DFs769 é um elicitador de indução de resistência sistêmica, sendo este mecanismo de ação desse biocontrolador um dos responsáveis pela redução do CBC no feijão.

Palavras-chaves: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Controle biológico. Indução de resistência sistêmica. ISR. *Phaseolus vulgaris*.

Abstract

SANGIOGO, Maurício. **Potential of control of bacterial blight in common bean with rhizobacteria in foliar spraying.** 2015. 58f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

Isolates bacterial biocontrollers of bacterial blight (BB) in common beans, through the seed microbiolization are known. However, there is no knowledge of the behavior of these isolates applied in leaves. In this context, the aims this study were: i) evaluate the potential BB control by foliar spray biocontrollers bacteria; ii) evaluate the effect of spray these bacteria when applied before and after the pathogen inoculation; iii) identify the potential of isolates biocontrollers bacteria to induce resistance in common bean plants to BB. To this, there were three essay in the greenhouse. In the essay I were realized spraying with bacterial suspensions with isolates: DFs93, DFs513, DFs769; and two combinations CO1 (DFs93 / DFs769 / DFs831) and CO3 (DFs348 / DFs769 / DFs831) in different moments of application: 48 and 24 hours before inoculation of pathogen (BIP) (*Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* - XAP) and 24 and 48 hours after inoculation of pathogen (API). In essay II were sprayed the isolates DFs513, DFs769 and CO3 combination, in 72 and 48 hours BPI and 48 hours API. Finally, essay III evaluated the potential of inducing resistance to CBB, through the spatial separation between pathogen and biocontroller. In the essay III, the isolates DFs513, DFs769 and CO3 combination, were sprayed 72 and 48 hours BPI. The spraying was carried out in different leaflets those where the pathogen was inoculated in two schemes: biocontroller in side leaflets and XAP in the apical leaflet; biocontroller in apical leaflet and XAP in the side leaflets. For all assays were realized five assessments of incidence, severity, calculated the área under the incidence progress curve (AUIPC) and area under the severity progress curve (AUSPC). In general, DFs769 and CO3 reduced the severity, AUIPC and AUDPC when applied preventively. The isolate DFs769 reduced the severity, AUIPC and AUDPC even when applied in different leaflet of pathogen application. The treatments DFs769 and CO3 are potential biocontroller of bacterial blight in common bean when applied by preventive foliar spray. Additionally, DFs769 treatment is a induction systemic resistance elicitor, and this is mechanism action this biocontroller, responsible for reducing the BB in common bean.

Keys-words: *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Biological control. Induction systemic resistance. ISR. *Phaseolus vulgaris*.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Esquema de aplicação I - biocontrolador nos folíolos laterais + patógeno no folíolo apical (A). Esquema de aplicação II - biocontrolador no folíolo apical + patógeno nos folíolos laterais (B). As folhas cobertas com papel alumínio foram posteriormente (48 ou 72 horas) inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.39

Lista de tabelas

- Tabela 1 - Identificação e habitat das bactérias utilizadas isoladamente e em combinação para o biocontrole de doenças do feijão20
- Tabela 2 - Escala de notas proposta por Rava (1984) para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* inoculada em folhas de feijão por cortes nos bordos dos folíolos....22
- Tabela 3 - Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) do ensaio I, para o crestamento bacteriano comum do feijão em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 24 e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação23
- Tabela 4 - Severidade do crestamento bacteriano comum do feijão no experimento I em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 24 e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação.....25
- Tabela 5 - Severidade do crestamento bacteriano comum do feijão no experimento II em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 72 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação.....27
- Tabela 6 - Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) do ensaio I para o crestamento bacteriano comum do feijão em função da pulverização foliar

	de diferentes biocontroladores, aplicados 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 24 e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação	29
Tabela 7	- Área abaixo da curva de progresso da severidade do ensaio II para o crestamento bacteriano comum do feijão em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 72 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação	30
Tabela 8	- Identificação e habitat das bactérias utilizadas isoladamente e em combinação para o biocontrole de doenças do feijão	38
Tabela 9	- Escala de notas proposta por Rava (1984) para <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> inoculada em folhas de feijão por cortes nos bordos dos folíolos....	40
Tabela 10	- Área abaixo da curva de progresso da incidência do crestamento bacteriano comum do feijão em função da aplicação de diferentes biocontroladores pela pulverização foliar, em diferentes momentos de aplicação e em dois esquemas de indução de resistência. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação	41
Tabela 11	- Severidade do crestamento bacteriano comum do feijão em função da aplicação de diferentes biocontroladores pela pulverização foliar, em diferentes momentos de aplicação e em dois esquemas de indução de. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação	43
Tabela 12	- Área abaixo da curva de progresso da severidade do crestamento bacteriano comum do feijão em função da aplicação de diferentes biocontroladores pela pulverização foliar, em diferentes momentos de aplicação e em dois esquemas de indução de resistência. <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. CAPÍTULO I – PULVERIZAÇÃO FOLIAR DE BACTÉRIAS PARA O CONTROLE BIOLÓGICO DO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM EM FEIJÃO	18
2.1 Introdução.....	18
2.2 Material e Métodos	19
2.2.1 Condução dos ensaios.....	19
2.2.2 Microrganismos utilizados e sua manutenção	19
2.2.3 Preparo das suspensões	20
2.2.4 Pulverização das bactérias biocontroladoras e inoculação do patógeno	21
2.2.4 Avaliações.....	21
2.2.5 Delineamento experimental e procedimentos estatísticos	22
2.3 Resultados e discussão.....	23
2.3 Conclusões	35
3. CAPÍTULO II – Indução de resistência a <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> pela pulverização foliar de bactérias.....	36
3.1 Introdução.....	36
3.2 Material e métodos	37
3.2.1 Condução dos ensaios.....	37
3.2.2 Microrganismos utilizados e sua manutenção	38
3.2.3 Preparo das suspensões	38
3.2.4 Pulverização e inoculação do patógeno	39
3.2.5 Avaliações.....	40
3.2.6 Delineamento experimental e procedimentos estatísticos	41

3.3	Resultado e discussão.....	41
3.4	Conclusões	46
4.	CONCLUSÕES	47
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO GERAL

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.), constitui-se um alimento básico para a população brasileira, ocupando lugar de destaque na agricultura, sendo caracterizado como forte produto no mercado interno, com grãos que representam uma importante fonte de proteínas e minerais na dieta da população (CARVALHO et al., 2014). Além disso, possui notória importância socioeconômica, pois cerca de 90% da produção nacional é oriunda de pequenas propriedades rurais (CNPAP, 2013).

O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão, tendo mercado interno garantido, clima favorável e disponibilidade de área para cultivo, no entanto, ainda deixa a desejar em termos de produtividade. Segundo estimativas da CONAB (2015), na safra 2013/2014, o Brasil produziu 3,45 milhões de toneladas em uma área de 3,17 milhões de hectares, portanto com uma média de rendimento de apenas 1071 kg ha⁻¹, enquanto o potencial produtivo da maioria das cultivares existentes no mercado é maior que 4000 kg ha⁻¹ (GUERRA; SILVA; RODRIGUES, 2000). Assim, a produção de feijão é insuficiente para abastecer o mercado interno, devido aos baixos rendimentos da cultura (MAPA, 2015).

A instabilidade acentuada da produtividade da cultura do feijão é devido à sua alta sensibilidade a eventos climáticos e doenças. Em função da expansão das áreas cultivadas no Brasil e do cultivo sucessivo, principalmente em áreas irrigadas, ocorreu grande aumento do inóculo e disseminação dos patógenos.

Os patógenos que acometem a cultura do feijão apresentam etiologia diversa, sendo os principais, fungos, bactérias e vírus. Dentre as doenças causadas por bactérias, o crestamento bacteriano comum (CBC), incitado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye (XAP), é considerado o de maior importância no

Brasil, tanto pela sua dificuldade de controle como pelo seu potencial de dano (SARTORATO; RAVA; RIOS, 1996; VALE; COSTA; ZAMBOLIM, 1997).

O CBC causa prejuízos na produção, em razão da sua ampla distribuição nas regiões produtoras de feijão do Brasil e ao seu difícil controle. Os sintomas aparecem em toda a parte aérea da planta, afetando folhas, caules e sementes. Nas folhas são observadas manchas encharcadas que progridem para necróticas, que normalmente apresentam-se margeadas por uma zona de tecido amarelo-limão (RAVA; SARTORATO, 1994). No caule formam-se manchas ou estrias com aspecto de anasarca, que se tornam avermelhadas. Em vagens, as lesões são normalmente circulares, em anasarca, evoluindo para manchas necróticas. Quando as lesões se apresentam de forma alongada, é sinal de avanço da infecção, possibilitando a posterior infecção das sementes que podem apresentar descoloração do hilo, manchas amareladas no tegumento, enrugamento e má formação (CANTERI; DALLA PRIA; SILVA, 1999). As perdas em produção da cultura do feijão devido ao CBC podem variar de 10 a 70% (DIAZ, 2000). Isso pode ser explicado em virtude da redução da taxa fotossintética das folhas infectadas (DIAZ et al., 2001).

A ocorrência de epidemias de XAP é altamente dependente de condições climáticas favoráveis. As condições climáticas que favorecem o desenvolvimento de XAP são: temperatura acima de 28 °C, alta umidade do ar e precipitações pluviométricas frequentes (RAVA; SARTORATO, 1994). O tempo entre a infecção inicial e disseminação secundária gira em torno de 10 a 14 dias (KARAVINA, 2006). A fonte de inóculo pode ser restos culturais, sementes contaminadas e hospedeiros secundários.

A sobrevivência de XAP em restos culturais está diretamente relacionada com as condições de temperatura, precipitação e localização no perfil do solo. Segundo Torres, Maringoni e Silva (2009), XAP pode sobreviver em restos culturais de feijão na superfície do solo por até 180 dias, já quando os restos culturais são incorporados ao solo esse período máximo de sobrevivência cai para 120 dias, isso em condições de temperatura mais amena e baixas precipitações, no entanto sob alta temperatura e altas precipitações a bactéria pode sobreviver no máximo até 60 e 45 dias, sobre a superfície do solo e incorporado, respectivamente.

A semente constitui outra importante forma de sobrevivência e fonte de inóculo de XAP. Os dados de sobrevivência de XAP em sementes são muito variáveis, têm-se resultados de pesquisa que indicam que a mesma possa sobreviver seis

(WALLEN, 1980) e até mesmo dez anos (ZAUMEYER, 1957) infectando sementes. Tendo-se em vista que na prática, as sementes de feijão são utilizadas na maioria das vezes em período inferior a dois anos após a colheita, a sobrevivência do patógeno em sementes contaminadas, e seu conseqüente papel na disseminação do patógeno é garantido.

Além de sementes e restos de cultura, XAP pode sobreviver em uma ampla gama de espécies de plantas voluntárias que podem atuar como hospedeiros secundários, contribuindo assim para sua manutenção no campo. Entre essas plantas, destacam-se: *Acalypha alopoides* (cola de gato), *Ambrosia artemisifolia* (cravo da roça), *Amaranthus* spp. (caruru), *A. retroflexus* (caruru), *Chenopodium album* (fedegoso), *Cyperus rotundus* (tiririca), *Physalis* sp., *Portulaca oleraceae* (beldroega), *Sida rhombifolia* (guanxuma), *Ruellia tuberosa*, *Strophostyles helvola*, *Vicia sativa* (fava) e *V. villosa* (ervilhaca) (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 1997).

Atualmente, não se tem estudos no Brasil que indiquem o nível de incidência considerado crítico, para o desenvolvimento de uma epidemia de XAP em feijão. Estudos realizados no Canadá indicam que lotes de sementes com apenas 0,5% de incidência do patógeno já foram suficientes para causar severas epidemias. Ito et al. (1989), analisando a incidência de XAP em lotes de sementes de feijão do Estado de São Paulo, nos anos de 1991 e 1993, observaram, respectivamente que 5,3% e 30,6% dos lotes de sementes estavam infectados por XAP. Já no estado do Paraná, segundo Torres, Maringoni e Silva (2009), 50% dos lotes de sementes foram portadores de XAP com incidência de 0,1% a 1,7%.

Segundo Cafati e Kimati (1982), existe variabilidade de patogenicidade de isolados de XAP provenientes de diferentes regiões do Brasil. Ainda no Brasil, Cardoso e Leite (1993), também encontraram variabilidade de agressividade entre isolados do Paraná. Fourie e Herselman (2011), estudando 143 isolados de XAP, na África, concluíram que, dentre os isolados testados, não se teve a presença de raças, no entanto ocorreu uma variação de agressividade dentre os isolados em determinados cultivares de feijão.

Diferentes medidas de controle têm sido recomendadas, visando à redução de danos por doenças na cultura do feijão, dentre as quais se destacam o controle genético e químico. O controle genético seria a medida mais eficiente e viável, no

entanto, a alta variabilidade de virulência do patógeno (VIEIRA; SOUZA, 2000) prejudica o desenvolvimento de cultivares resistentes de ampla adaptação (NAVARRETE-MAYA; ACOSTA-GALLEGOS; ESPINOSA, 1996), além disso, a maioria das cultivares de feijão em uso comercial no país são suscetíveis a XAP, geralmente, alcançando no máximo um nível de resistência considerado “moderado” (CEPEF, 2000). No caso do controle químico, seu uso indiscriminado pode causar efeitos adversos para a saúde humana e para o ambiente (MOREIRA et al., 2002). Além do mais, o controle químico eleva os custos de produção e pode acarretar o surgimento de populações de patógenos resistentes ao grupo químico utilizado (VALE; COSTA; ZAMBOLIM, 1997). Adicionalmente, no caso de bacterioses, o controle químico é economicamente inviável e ineficiente na maioria dos casos, sendo as principais medidas recomendadas de caráter preventivo (MOURA; CORRÊA; DENARDIN, 2009).

Assim, tem-se a necessidade da busca de métodos de controle mais eficientes, com um menor impacto ambiental e que apresentem menor custo. Dentre os métodos mais estudados está o controle biológico por microrganismos.

Na cultura do feijão, o controle biológico tem sido estudado principalmente no manejo de doenças da parte aérea, tais como crestamento bacteriano (ZANATTA et al., 2007; SILVA et al., 2009; VIEIRA-JÚNIOR, 2005; CORRÊA, 2007), ferrugem (VIEIRA-JÚNIOR, 2005), mancha angular (CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014; GARCIA, 2008), antracnose (PEDRO et al., 2012; CORRÊA et al., 2008) e no controle de doenças de raiz e caule como a murcha-de-fusário (DIAS; BERBARA; FERNANDES, 2013; CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014), murcha bacteriana (CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014; MARTINS et al., 2013), podridão-cinzenta (KHUN, 2007; CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014), mela (AHMADZADEH; TEHRANI, 2009) e mofo branco (HUANG et al., 2000).

O Grupo de Pesquisa “Controle Biológico de Doenças de Plantas e Promoção de Crescimento Vegetal”, coordenado pela Universidade Federal de Pelotas, selecionou bactérias biocontroladoras eficientes quando utilizadas individualmente ou em combinação para microbiolizar as sementes de feijão, controlando o crestamento bacteriano comum (ZANATTA, 2004; SILVA, 2004; CORRÊA, 2007). Posteriormente, a equipe identificou que essas bactérias, quando utilizadas em combinação, aumentavam a efetividade do controle da XAP (SANTOS, 2006), bem como ampliavam seu espectro de ação, passando a controlar também a

mancha angular, antracnose, podridão cinzenta, murcha de curtobactério, murcha de fusário (CORRÊA; SCHÄFER; MOURA, 2014) e nematoide das galhas (CORRÊA et al., 2012). Também foi estabelecido que essas bactérias selecionadas, quando usadas para microbiolizar as sementes, podem atuar por diferentes mecanismos de ação como antibiose (ZANATTA, 2004; SILVA, 2004; CORRÊA, 2007; CORRÊA et al., 2008; CORRÊA, 2010), competição (CORRÊA, 2010) e indução de resistência (SILVA et al., 2009).

Recentemente, foram realizados ensaios preliminares aventando a possibilidade do uso destas bactérias biocontroladoras, tanto isoladas quanto combinadas, para pulverização foliar, visando o controle do crestamento bacteriano comum (ANACKER, 2013). A aplicação dessas bactérias biocontroladores por pulverização também pode ser uma estratégia interessante no manejo do CBC, uma vez que nem sempre o produtor tem a disponibilidade do biocontrolador no momento do plantio, ou até mesmo, diante da dificuldade da microbiolização e das técnicas que ela demanda, essa tarefa pode ser feita de maneira errônea, prejudicando a eficiência da mesma. Além disso, pensando na antibiose e competição como mecanismos de controle, o sucesso do biocontrole com a deposição foliar do biocontrolador é mais provável, uma vez que XAP ocorre predominantemente em folhas, hastes e vagens. A aplicação do biocontrolador por pulverização das folhas tem se mostrado eficiente no controle de doenças em diferentes culturas, como no algodão (KAPADIYA; BUTANI; KHANPARA, 2015), arroz (SHINDE; PRASHANTHI; KRISHNARAJ, 2014) e inclusive na cultura do feijão (GARCIA; ROMEIRO, 2011).

Neste contexto, teve-se como objetivo no presente estudo, avaliar o potencial de controle do crestamento bacteriano comum do feijão através da pulverização foliar de suspensão de bactérias pré-selecionadas, por meio da microbiolização de sementes, bem como verificar o mecanismo pelo qual se dá o controle do crestamento bacteriano comum do feijão.

2. CAPÍTULO I – Pulverização foliar de bactérias para o controle biológico do crestamento bacteriano comum em feijão

2.1 Introdução

A cultura do feijão é muito sensível a fatores bióticos e abióticos, fato que se traduz em alta instabilidade em termos de produtividade. Dentre os fatores bióticos, as doenças destacam-se como as principais responsáveis pela quebra da produtividade.

A cultura do feijão é vulnerável a vários organismos fitopatogênicos (VIGO et al., 2009), sendo que na parte aérea, as doenças bacterianas apresentam grande importância na cultura do feijão, em que o crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) (XAP) é considerada a de maior importância (SARTORATO et al., 1996; VALE; COSTA; ZAMBOLIM, 1997).

O CBC é uma doença de difícil controle, baseando-se principalmente em medidas de caráter preventivo. A eficácia do controle químico do CBC do feijão, através de pulverização das plantas com produtos bactericidas, tem sido de pouca magnitude nas lavouras, devido à baixa eficiência destes produtos (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005; MOURA; CORRÊA; DENARDIN, 2009). Além disso, os produtos registrados para o controle da XAP na cultura do feijão são escassos, baseando-se em indutores de resistência (acibenzolar-S-metílico) e protetores (hidróxido de cobre) (AGROFIT, 2015).

Assim, surge a necessidade de buscar métodos de controle mais eficientes, de menor custo e que interfiram menos no equilíbrio do ambiente. Dentre os métodos mais estudados está o controle biológico por microrganismos. Nos últimos anos, vários trabalhos foram publicados mostrando o controle biológico de bacterioses causadas por *Xanthomonas* spp. (SINGH; SIDDIQUI, 2015; HALFELD-

VIEIRA, et al., 2015; NAUE; ROCHA; MOURA, 2014), inclusive trabalhos mostrando sua efetividade especificamente a XAP (ZANATTA et al., 2007; SILVA et al., 2009; VIEIRA-JÚNIOR, 2005; CORRÊA, 2007).

O Grupo de Pesquisa “Controle Biológico de Doenças de Plantas e Promoção de Crescimento Vegetal” – UFPel, selecionou bactérias com potencial para o biocontrole quando utilizadas individualmente ou em combinação para microbiolizar sementes de feijão, controlando, dentre outras doenças, o crestamento bacteriano comum (ZANATTA, 2004; SILVA, 2004; CORRÊA, 2007; SANTOS, 2006; CORRÊA, 2010).

No entanto, ainda se tem carência de informações quanto à efetividade do controle do CBC, quando a deposição do biocontrolador for por pulverização foliar. Neste caso, também se faz necessário conhecer como estes biocontroladores atuariam, se com efeito curativo, ou se seria necessário que os mesmos fossem aplicados em caráter preventivo.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar bactérias biocontroladoras por meio da pulverização em folhas de feijão, aplicadas em diferentes espaços de tempo anterior e posteriormente à inoculação do patógeno, visando o controle do CBC.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Condução dos ensaios

A semeadura do feijão foi realizada em vasos com capacidade para 2 kg, em substrato comercial não esterilizado. Foram semeadas cinco sementes por vaso, cultivar BRS Valente. Após emergência, realizou-se o desbaste deixando-se duas plantas por vaso. As plantas foram mantidas em casa de vegetação em condições de temperatura semicontroladas, com irrigação por microaspersão. Os ensaios foram realizados entre o período de novembro de 2014 e fevereiro de 2015.

2.2.2 Microrganismos utilizados e sua manutenção

Os isolados bacterianos utilizados (tab. 1) são pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Departamento de Fitossanidade (DFs) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Essas bactérias, foram selecionadas para

o controle do cretamento bacteriano comum do feijão quando microbiolizadas a sementes (CORRÊA, 2007; ZANATTA et al., 2007).

A bactéria patogênica utilizada foi *X. axonopodis* pv. *phaseoli* isolado XAP28, cedido pela Embrapa Clima Temperato (Embrapa CPACT). A patogenicidade da bactéria foi comprovada utilizando o método de inoculação da folha por corte com tesoura, conforme descrito por Dhingra e Sinclair (1995).

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

Isolados	Identificação*	Nichos
DFs093*	<i>Bacillus cereus</i> Frank. & Frank.	Solo
DFs348**	<i>Bacillus</i> sp. Cohn	Folha de cebola
DFs513	<i>Pseudomonas veronii</i> Elomari	Túnica de cebola
DFs769	<i>B. cereus</i> Frankland & Frankland	Vagem de feijão
DFs831**	<i>P. fluorescens</i> Migula	Solo rizosférico
CO1	DFS093+DFs769+DFs831	
CO3	DFs348+DFs769+DFs831	

* Determinados por sequenciamento do gene 16S rDNA (dados não publicados).

** Bactéria utilizada apenas em combinações.

Os isolados bacterianos foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970), em geladeira a 4 °C. O isolado de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi também preservado em tubos de ensaio contendo meio GYCA (SWINGS; VAUTERIN; KERSTERS, 1993), bem como em água estéril. A longo prazo, os isolados foram preservados em óleo, em glicerina e em solo (ROMEIRO, 2001).

2.2.3 Preparo das suspensões

As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) e incubadas por 24 h à temperatura de 28 °C. Após, adicionou-se solução salina (NaCl 0,85%) e suspenderam-se os crescimentos bacterianos com uma alça de platina, sendo preparadas as suspensões para cada um dos isolados e do patógeno.

A concentração das suspensões foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540} = 0,4$ para as bactérias biocontroladoras e $A_{540} = 0,2$ para o patógeno. As combinações de bactérias foram compostas utilizando-se volumes iguais de suspensão de cada bactéria individualmente, sendo posteriormente misturadas.

2.2.4 Pulverização das bactérias biocontroladoras e inoculação do patógeno

Para a aplicação das suspensões dos biocontroladores (pulverização) foram utilizadas suspensões das bactérias biocontroladoras (tab. 1). No experimento I, os tratamentos foram: DFs93, DFs513, DFs769, CO1, CO3 e testemunha (solução salina a 0,85% de NaCl). No experimento II, os tratamentos foram: DFs513, DFs769, CO3 e testemunha.

A pulverização com os biocontroladores foi realizada em períodos distintos em relação a inoculação do patógeno, a saber: no experimento I - 24 e 48 horas antes da inoculação da XAP e 24 e 48 horas após a inoculação da XAP, e no experimento II - 72 e 48 horas antes da inoculação do XAP e 48 horas após a inoculação da XAP.

A aplicação dos biocontroladores foi realizada após a planta atingir o ponto de completa expansão da terceira folha trifoliada, por meio de um borrifador manual, até ponto de escorrimento.

A inoculação do patógeno foi realizada imergindo-se uma tesoura na suspensão de inóculo de XAP e posteriormente executando-se dez cortes por trifólio (ROMEIRO, 2001). As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas após a inoculação.

2.2.4 Avaliações

As avaliações de incidência e severidade iniciaram-se ao surgirem os primeiros sintomas nas testemunhas, o que correspondeu a 72 e 96 horas após a inoculação da XAP nos experimentos I e II, respectivamente. Para incidência foi considerado o número de cortes nas folhas que apresentavam sintomas do crestamento bacteriano comum. Para severidade foram realizadas cinco avaliações com intervalos de dois dias, atribuindo-se nota para cada corte, de acordo com escala descritiva de Rava (1984) (tab. 2).

Tabela 2 - Escala de notas proposta por Rava (1984) para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* inoculada em folhas de feijão por cortes nos bordos dos folíolos

Notas	Sintomas observados
0	Ausência de sintomas
1	Clorose descontínua nos cortes
2	Clorose contínua nos cortes
3	Clorose e murcha o bordo da folha, sem ultrapassar a nervura lateral
4	Clorose e murcha que ultrapassam a nervura lateral
5	Clorose e murcha até o nível interno dos cortes
6	Clorose avançada e murcha da área cortada

Para incidência e severidade foi calculada a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), respectivamente, de acordo com a equação 1 (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

$$\Sigma = \left(\left(\frac{n1 + n2}{2} \right) \times n^{\circ} \text{ de dias} \right) + \dots \left(\left(\frac{nx + nx}{2} \right) \times n^{\circ} \text{ de dias} \right), \text{ [eq. 01], onde:}$$

n1: nota do primeiro dia avaliado;

n2: nota do segundo dia avaliado;

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

2.2.5 Delineamento experimental e procedimentos estatísticos

O experimento I foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 6x4 (biocontroladores x período), com seis repetições. A parcela experimental foi representada por um vaso com duas plantas.

O experimento II consistiu em uma repetição do experimento I, onde foram retirados os tratamentos ineficazes (biocontroladores e momentos de aplicação). Assim como no experimento I, o experimento II foi montado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x3, com sete repetições.

Os dados de severidade, AACPS e AACPI foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, através do programa Assistat 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2006).

2.3 Resultados e discussão

No experimento I, no qual foi avaliado o comportamento de diferentes isolados e combinações de bactérias biocontroladoras em diferentes momentos de aplicação em relação à inoculação do patógeno, não se observou diferença significativa na área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) em relação aos diferentes tratamentos bacterianos e momentos de aplicação (tab. 3)

Tabela 3 - Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) do ensaio I, para o crestamento bacteriano comum do feijão em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 24 e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamento	Momento de aplicação			
	48 horas AIP	24 horas AIP	24 horas PIP	48 horas PIP
Testemunha	796,7	782,8	788,3	780,0
DFS 93	730,0	758,0	795,0	761,1
DFS 513	777,7	765,4	796,3	736,5
DFS 769	754,0	779,4	776,7	795,0
CO1	766,7	771,0	775,7	790,0
CO3	763,0	779,2	758,3	788,3
CV (%)		11,00		
F_{biocontroladores}		1,22 ^{ns}		
F_{momento}		1,25 ^{ns}		
F_{interação}		1,34 ^{ns}		

^{ns} Não significativo segundo teste F a 5% de probabilidade de erro. DFS93 - *Bacillus Cereus*; DFS348- *Bacillus sp.*; DFS513 - *Pseudomonas veronii*; DFS769- *Bacillus cereus*; CO1 (DFS093+DFS769+DFS831 (*P. fluorescens*)); CO3 (DFS348+DFS769+DFS831 (*P. fluorescens*)).

Já no experimento II, se observou diferença significativa para biocontroladores e momento de aplicação (tab. 4). O momento de aplicação dos biocontroladores, onde verificou-se menor valor da AACPI foi 72 horas AIP, seguido pelo momento de aplicação 48 horas AIP, no entanto o último não diferiu estatisticamente do momento pós inoculação do patógeno. Em média, quando os biocontroladores foram aplicados 72 horas AIP, reduziram em 14,95% a incidência do patógeno.

Em relação aos biocontroladores aplicados, o tratamento DFS769 e CO3, no experimento II, apresentaram redução significativa da AACPI do patógeno,

reduzindo essa variável em relação a testemunha em 28,4% e 11,8%. O tratamento DFs513 não diferiu estatisticamente da testemunha.

Tabela 4 - Área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) do ensaio II para o crestamento bacteriano comum do feijão em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 72 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamento	Momento de aplicação			Média
	72 horas AIP	48 horas AIP	48 horas PIP	
Testemunha	688,8	739,8	686,5	705,0 a ¹
DFS 513	637,1	624,1	723,5	661,6 ab
DFS 769	492,9	558,6	638,6	563,3 c
CO3	607,8	534,6	650,0	597,5 bc
Média	606,7 B	614,3 AB	674,7 A	
CV (%)		11,00		
F_{biocontroladores}		9,75**		
F_{momento}		4,55*		
F_{interação}		1,00 ^{ns}		

* Significativo a 5% de probabilidade de erro segundo o teste F. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro segundo o teste F. ^{ns} Não significativo segundo teste F a 5% de probabilidade de erro. ¹Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. DFs93 - *Bacillus Cereus*; DFs348- *Bacillus sp.*; DFs513 - *Pseudomonas veronii*; DFs769- *Bacillus cereus*; C01 (DFs093+DFs769+DFs831 (*P. fluorescens*)); C03 (DFs348+DFs769+DFs831 (*P. fluorescens*)).

Analisando o efeito dos diferentes tratamentos, na severidade do CBC nos diferentes dias de avaliação, no experimento I (tab. 5), observou-se que os biocontroladores apresentaram comportamento distinto em função do momento de avaliação. Na primeira avaliação de severidade, realizada às 72 horas após a inoculação da XAP, não houve diferença significativa entre os biocontroladores testados, porém apresentando diferenças em relação ao momento de aplicação, onde as menores médias de severidade foram encontradas quando os biocontroladores foram aplicados às 24 e 48 horas antes da inoculação do patógeno.

Tabela 4 - Severidade do cretamento bacteriano comum do feijão no experimento I em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 24 e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamentos	Momento de aplicação			
	48 horas AIP	24 horas AIP	24 horas PIP	48 horas PIP
Primeira avaliação de severidade				
Testemunha	2,68 ^{ns}	2,01 ^{ns}	2,15 ^{ns}	2,03 ^{ns}
DFS 93	1,44	1,87	2,75	2,21
DFS 513	1,94	1,69	2,71	1,63
DFS 769	2,00	2,10	2,44	2,40
CO1	1,78	2,62	2,36	2,40
CO3	1,66	2,07	2,51	2,30
Média	1,92 B ¹	2,06 B	2,49 A	2,16 AB
Segunda avaliação de severidade				
Testemunha	3,36 Aa ²	4,01 aA	3,47 bA	3,62 abA
DFS 93	3,19 aAB	3,08 aAB	3,82 abA	2,88 bB
DFS 513	2,52 aB	3,06 aB	4,22 abA	2,89 bB
DFS 769	2,81 aB	3,24 aAB	3,57 bAB	3,83 abA
CO1	3,12 aB	3,43 aAB	3,44 bAB	4,23 aA
CO3	2,60 aC	3,21 aBC	4,72 aA	3,72 abB
Terceira avaliação de severidade				
Testemunha	4,18 aA	4,18 abA	3,75 bcA	4,48 aA
DFS 93	3,74 abAB	3,12 cB	4,14 bcA	4,23 aA
DFS 513	3,25 bcB	3,73 abcAB	4,63 abA	3,94 aAB
DFS 769	2,85 cB	3,42 bcB	5,39 aA	5,05 aA
CO1	3,54 abcB	4,08 abAB	4,12 bcAB	4,97 aA
CO3	3,12 bcB	4,38 aA	3,47 cB	4,60 aA
Quarta avaliação de severidade				
Testemunha	5,30 aA	5,32 aA	5,03 abA	5,22 abA
DFS 93	4,89 aA	5,01 aA	5,34 abA	4,66 abA
DFS 513	3,96 bcC	4,97 aAB	5,52 aA	4,57 bBC
DFS 769	3,86 cB	3,99 bB	5,07 abA	5,48 abA
CO1	4,73 abAB	4,61 abB	4,58 bB	5,53 aA
CO3	3,77 cC	4,67 abB	5,54 aA	5,02 abAB
Quinta avaliação de severidade				
Testemunha	5,47 aA	5,47 aA	5,35 abA	5,40 abA
DFS 93	5,15 abA	5,17 abA	5,30 abA	5,39 abA
DFS 513	4,97 abcB	5,07 abAB	5,53 abA	5,07 bAB
DFS 769	4,46 cB	4,88 bB	5,70 aA	5,67 aA
CO1	4,82 bcB	5,09 abB	5,00 bB	5,71 aA
CO3	4,50 cB	5,40 abA	5,27 abA	5,69 aA

^{ns} Não significativo, segundo teste F a 5% de probabilidade de erro. ¹ Diferença significativa para momento de aplicação, médias com letras maiúsculas iguais na linha não diferem entre si, segundo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. ² Interação significativa, médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. DFS93 - *Bacillus Cereus*; DFS348- *Bacillus* sp.; DFS513 - *Pseudomonas veronii*; DFS769- *Bacillus cereus*; CO1 (DFS093+DFS769+DFS831 (*P. fluorescens*)); CO3 (DFS348+DFS769+DFS831 (*P. fluorescens*)).

Nas demais avaliações de severidade, verifica-se interação significativa entre tratamentos e momento de sua aplicação. Na segunda avaliação de

severidade, ainda não foi possível identificar um biocontrolador eficiente em reduzir a severidade da doença. No entanto, na terceira avaliação de severidade, quando aplicados em caráter preventivo, os biocontroladores DFs513, DFs769 e CO3 apresentaram os menores valores 48 horas AIP (redução de 22,2%, 31,8% e 25,4%, respectivamente), e os biocontroladores DFs93 e DFs769 os menores valores quando aplicados 24 horas AIP (redução de 25,4% e 18,2%, respectivamente). Em média de todos tratamentos, a aplicação de biocontroladores reduziu a severidade da terceira avaliação em 21,1 % e 10,4%, nos momentos de aplicação 48 e 24 horas AIP, respectivamente.

Tanto na quarta como quinta avaliação, quando os biocontroladores foram aplicados 48 horas AIP, os menores valores para severidade foram encontrados com os tratamentos DFs769 e CO3, diferindo da testemunha. Quando aplicados 24 horas AIP, o melhor tratamento manteve-se o DFs769, para ambas avaliações de severidade.

Biocontroladores aplicados curativamente não se mostraram eficazes na redução da severidade, não diferindo da testemunha em nenhum dos momentos testados (24 e 48 horas PIP).

No experimento II (tab. 6), observou-se que na primeira e terceira avaliação de severidade não ocorreu interação significativa entre momento de aplicação e biocontroladores. Em ambas avaliações o momento de aplicação que resultou em menores médias de severidade foi 72 e 48 horas AIP, e os biocontroladores que resultaram em menor severidade foram o DFs769 e CO3.

Nas demais avaliações de severidade observou-se interação significativa entre momento de aplicação e biocontroladores. Na segunda avaliação de severidade, quando aplicados 72 horas AIP, os biocontroladores DFs513 e DFs769 apresentaram os menores valores de severidade, já quando aplicados 48 horas AIP todos tratamentos apresentaram redução significativa de severidade, e quando aplicados após a inoculação do patógeno, 48 horas PIP, os melhores tratamentos foram DFs769 e CO3.

Na quarta avaliação de severidade, quando biocontroladores foram aplicados 72 horas AIP, os melhores tratamentos foram DFs769 e CO3, já quando aplicados 48 horas AIP os melhores foram DFs513 e DFs769 e quando aplicados às 48 horas PIP a menor média de severidade foi encontrada com a aplicação da combinação 3 (CO3). Na quinta avaliação de severidade, o tratamento DFs769

apresentou os menores valores de severidade quando os biocontroladores foram aplicados 72 horas AIP, porém no momento de aplicação 48 horas AIP todos os tratamentos mostraram-se estatisticamente menores que a testemunha, e no momento de aplicação de 48 horas PIP, assim como para a quarta avaliação de severidade, a menor média de severidade foi encontrada com a aplicação da combinação CO3.

Tabela 5 - Severidade do crestamento bacteriano comum do feijão no experimento II em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 72 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamento	Momento de aplicação			Média
	72 horas AIP	48 horas AIP	48 horas PIP	
Primeira avaliação de severidade ¹				
Testemunha	1,10	1,21	1,78	1,36 a
DFS 513	1,04	1,07	1,82	1,31 ab
DFS 769	0,49	0,41	1,43	0,78 c
CO3	0,63	0,82	1,20	0,88 bc
Média	0,82 B	0,87 B	1,56 A	
Segunda avaliação de severidade ²				
Testemunha	2,29 aA	2,60 aA	2,70 aA	-
DFS 513	1,37 bcB	1,02 bB	2,65 aA	-
DFS 769	0,84 cA	1,09 bA	1,41 bA	-
CO3	1,69 abA	0,92 bB	1,44 bAB	-
Terceira avaliação de severidade ¹				
Testemunha	3,36	3,54	3,82	3,57 a
DFS 513	2,92	2,51	3,67	3,03 b
DFS 769	1,37	1,35	2,20	1,64 c
CO3	1,44	0,95	2,22	1,53 c
Média	2,27 b	2,09 b	2,98 a	
Quarta avaliação de severidade ²				
Testemunha	3,76 aA	3,74 aA	3,92 aA	-
DFS 513	3,09 abAB	2,19 bB	4,08 aA	-
DFS 769	2,26 bAB	1,73 bB	2,74 abA	-
CO3	2,18 bA	2,56 abA	2,23 bA	-
Quinta avaliação de severidade ²				
Testemunha	4,04 aAB	5,25 aA	4,05 abB	-
DFS 513	4,49 aA	2,45 bB	3,57 abA	-
DFS 769	2,37 bB	2,88 bB	4,21 aA	-
CO3	3,46 abA	3,04 bA	2,98 bA	-

¹Interação não significativa, momento de aplicação e biocontroladores foram analisados separadamente.

²Interação significativa, dados foram analisados dentro de cada nível do fator momento de aplicação e biocontroladores. Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

DFS513 - *Pseudomonas veronii*; DFS769- *Bacillus cereus*; C01 (DFS093(*B. cereus*)+DFS769+DFS831 (*P. fluorescens*)); C03 (DFS348 (*Bacillus* sp.)+DFS769+DFS831 (*P. fluorescens*)).

Na quarta avaliação de severidade, quando biocontroladores foram aplicados 72 horas AIP, os melhores tratamentos foram DFs769 e CO3, já quando aplicados 48 horas AIP os melhores foram DFs513 e DFs769 e quando aplicados às 48 horas PIP a menor média de severidade foi encontrada com a aplicação da combinação (CO3). Na quinta avaliação de severidade, o tratamento DFs769 apresentou os menores valores de severidade quando os biocontroladores foram aplicados 72 horas AIP, porém no momento de aplicação 48 horas AIP, todos os tratamentos mostraram-se estatisticamente menores que a testemunha, e no momento de aplicação de 48 horas PIP, assim como para a quarta avaliação de severidade, a menor média de severidade foi encontrada com a aplicação da CO3.

No experimento I, avaliando o comportamento de diferentes isolados e combinações de bactérias biocontroladoras em diferentes momentos de aplicação em relação à inoculação do patógeno, na AACPS, observou-se que essa variável apresentou interação significativa entre momento de aplicação e isolados aplicados (tab. 7), sendo assim, a resposta aos tratamentos se mostrou diferencial para cada momento de aplicação testado. No experimento II, que constituiu em uma repetição do experimento I, excluindo-se os tratamentos com menor eficiência, os resultados da AACPS (tab. 8) mostraram mesmo padrão do experimento I.

Avaliando-se o comportamento dos biocontroladores em relação ao momento da aplicação, observa-se que de uma maneira geral, o melhor período de aplicação dos biocontroladores foi anterior à inoculação da XAP. No experimento I, a aplicação dos biocontroladores em média reduziu em 20,8% o valor da AACPS quando aplicados às 48 horas AIP e 11,9% quando aplicados 24 horas AIP.

No experimento II, ainda avaliando o comportamento dos biocontroladores em relação ao momento da inoculação da XAP, o período de aplicação que resultou em menores valores da AACPS foi anterior a inoculação da XAP, ou seja, em caráter preventivo, com exceção para o tratamento CO3, onde o momento de aplicação não apresentou influência significativa nos valores dessa variável. A aplicação dos biocontroladores em média reduziu em 34% o valor da AACPS quando aplicados às 72 horas AIP e 50% quando aplicados às 48 horas AIP e 24,5% quando aplicados às 48 horas PIP.

Tabela 6 - Área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) do ensaio I para o crestamento bacteriano comum do feijão em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 48 e 24 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 24 e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamento	Momento de aplicação			
	48 horas AIP	24 horas AIP	24 horas PIP	48 horas PIP
Testemunha	33,93 aA ¹	35,60 aA	30,68 bA	34,29 abA
DFS 93	29,18 abAB	31,68 aAB	34,64 abA	28,12 bcB
DFS 513	26,95 bB	30,80 aAB	35,13 abA	27,32 cB
DFS 769	24,84 bB	30,23 aB	37,89 aA	36,56 aA
CO1	29,11 abB	32,00 aAB	31,05 bB	37,70 aA
CO3	24,19 bB	32,02 aA	32,31 abA	35,17 aA
CV (%)		12,82		
F_{biocontroladores}		2,52*		
F_{momento}		14,12**		
F_{interação}		4,39**		

* Significativo a 5% de probabilidade de erro segundo o teste F. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro segundo o teste F. ¹ Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em análise do desempenho dos diferentes tratamentos em cada momento de aplicação, nota-se que no experimento I, quando os biocontroladores foram aplicados 48 horas AIP os tratamentos CO3, DFs769 e DFs513 apresentaram os menores valores de AACPS (redução de 28,7%, 26,8% e 20,6%, respectivamente), diferindo da testemunha. Biocontroladores aplicados 24 horas AIP apresentaram uma tendência na redução da AACPS, porém não diferindo estatisticamente da testemunha. Quando os biocontroladores foram aplicados em caráter curativo, às 24 horas PIP, notou-se que os tratamentos não foram eficientes em reduzir a AACPS, porém quando aplicado 48 horas PIP o tratamento DFs513 mostrou os menores valores da variável em questão (redução de 20,3%).

Já no experimento II, quando os biocontroladores foram aplicados 72 horas AIP os tratamentos DFs769 e CO3 apresentaram os menores valores de AACPS (redução de 50,5% e 39%, respectivamente), diferindo da testemunha. No experimento II todos tratamentos testados (DFs513, DFs769 e CO3) quando aplicados 48 horas AIP apresentaram uma redução significativa da AACPS (redução de 43%, 55,7% e 51,5%, respectivamente). Quando os biocontroladores foram aplicados em caráter curativo, 48 horas PIP, os tratamentos DFs769 e CO3

apresentaram os menores valores de AACPS (redução de 31,3% e 40,2%, respectivamente), diferindo da testemunha.

Tabela 7 - Área abaixo da curva de progresso da severidade do ensaio II para o crestamento bacteriano comum do feijão em função da pulverização foliar de diferentes biocontroladores, aplicados 72 e 48 horas antes da inoculação do patógeno (AIP) e 48 horas após inoculação do patógeno (PIP). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamentos	Momento de aplicação		
	72 horas AIP	48 horas AIP	48 horas PIP
Testemunha	23,97 Aa	26,23 aA	26,71 aA
DFS 513	20,28 abB	14,96 bC	26,21 aA
DFS 769	11,82 cB	11,63 bB	18,35 bA
CO3	14,63 bcA	12,72 bA	15,97 bA
CV (%)		21,89	
F_{biocontroladores}		38,80**	
F_{momento}		13,54**	
F_{interação}		2,66*	

* Significativo a 5% de probabilidade de erro segundo o teste F. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro segundo o teste F. ¹ Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

De modo geral, a pulverização foliar dos biocontroladores para o controle do CBC do feijão proporcionou redução das variáveis analisadas em ambos os ensaios. No entanto, quando se observa as variáveis estudadas no presente ensaio, a AACPI foi a que teve menor resposta em função da aplicação dos diferentes biocontroladores testados. O isolado DFs769 e a CO3 foram os únicos tratamentos capazes de reduzir significativamente os valores da AACPI, porém, apenas no segundo experimento. Zanatta et al. (2007), também encontrou resultados positivos em relação a redução de incidência de XAP quando sementes de feijão eram microbiolizadas com o isolado DFs769. No entanto, em contraste aos resultados encontrados no presente trabalho, os isolados DFs93 e DFs513 também apresentaram redução de incidência no trabalho citado anteriormente. Por outro lado, foi possível verificar a redução significativa da severidade dos sintomas de CBC a partir da segunda avaliação, o que resultou em um intenso efeito acumulado (AACPS). De uma maneira geral, em uma análise conjunta das variáveis avaliadas pode-se dizer que os melhores tratamentos foram DFs769 (*B. cereus*), DFs513 (*P. veronii*) e CO3 (*Bacillus* sp. + *B. cereus* + *P. fluorescens*). Como pode ser visto, um dos melhores tratamentos consistiu no uso da combinação de biocontroladores, a

combinação CO3, no entanto, essa observação não se vale como regra, já que a combinação CO1, de uma maneira geral, não diferiu da testemunha.

Embora a maioria dos trabalhos utilizem aplicações de biocontroladores em sementes e solo, a pulverização foliar vem se mostrando eficaz no controle de doenças foliares, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho. Assim, trabalho realizado em arroz, visando comparar diferentes formas de aplicações de *P. fluorescens* para o controle de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (XOO), mostrou que o melhor desempenho foi encontrado com a associação de aplicações foliares, em solo e em sementes (JEYALAKSHMI; MADHIAZHAGAN; RETTINASSABABADY, 2010). Mishra e Arora (2012), em trabalho avaliando dois isolados de bactérias rizosféricas, *Pseudomonas* e *Bacillus*, para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (XCC) em *Brassica campestris*, chegaram a reduzir a doença entre 32 a 57 % quando na aplicação foliar dos biocontroladores, embora o maior percentual de redução da doença tenha sido alcançado, com a combinação de microbiolização de sementes e aplicação em solo. Vieira-Junior (2005), pulverizando a parte aérea de plantas de feijão com diferentes biocontroladores, obteve controle em torno de 55% do CBC, com os isolados UFV-108 e UFV-172 (*Bacillus cereus* e *Pseudomonas putida*, respectivamente).

Os resultados da AACPS do experimento I e II apontam para o mesmo sentido, em que os melhores resultados são alcançados com aplicações preventivas, mais especificamente no período de 48 horas AIP. De uma maneira geral, os resultados de severidade e AACPI, também indicam ser as aplicações preventivas as mais eficientes no controle do CBC. No entanto, mesmo que em menor expressão, há evidência de controle em caráter curativo em determinados tratamentos.

Um melhor biocontrole em caráter preventivo é esperado por vários motivos. Primeiro, considerando o biocontrole pelo mecanismo de competição, o biocontrolador estando presente antecipadamente ao patógeno aumentaria as chances de multiplicar-se e colonizar o mesófilo foliar, estando assim em vantagem quando à chegada do patógeno. Os isolados estudados no presente trabalho apresentam boa diversidade metabólica, principalmente os isolados DFs93, DFs348 e DFs769 (RODRIGUEZ, 2015), e produzem sideróforos no caso do isolado DFs513, DFs348 e DFs769 (RODRIGUEZ, 2015; CORRÊA, 2010), o que é um indicativo que os mesmos são bons competidores. Halfeld-Vieira et al. (2015), identificaram que a

competição por ferro e por compostos nitrogenados em folhas explicou o controle de *X. axonopodis* pv. *passiflorae* em maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*). Segundo, considerando-se a antibiose como mecanismo de biocontrole, o biocontrolador estando a mais tempo no ambiente, possibilitaria um maior acúmulo de compostos tóxicos ao patógeno, caso estes sejam produzidos independentemente da presença do microrganismo patogênico. Vários trabalhos têm apontado a antibiose como mecanismo responsável pelo biocontrole de fitopatógenos (KUMSINGKAEW; AKARAPISAN, 2014; LANNA FILHO; ROMEIRO; ALVES, 2011). Terceiro, considerando-se a resistência sistêmica induzida (ISR) como mecanismo de biocontrole, seria necessário a presença do biocontrolador antecipadamente ao patógeno. A indução de resistência pode ocorrer, dentre outros eventos, pela presença de microrganismos benéficos (PIETERSE et al., 2014). Vários trabalhos têm mostrado o potencial de microrganismos benéficos em induzir ISR (SILVA et al., 2009; PLANCHAMP; GLAUSER; MAUCH-MANI, 2015; FIGUEREDO et al., 2014; BARRETTI et al., 2012).

Um melhor controle em aplicações preventivas tem sido encontrado na literatura, não exclusivamente para aplicação do agente biocontrolador em si, mas em alguns casos pela aplicação de produtos produzidos pelos mesmos. Spago et al. (2014), estudaram o efeito da aplicação de diferentes frações de compostos produzidos por *P. aureginosa*, com atividade inibitória contra *Xanthomonas* spp., preventivamente (24 horas antes) e curativamente (24 horas depois) à inoculação do patógeno. Os resultados indicam que as aplicações preventivas de determinadas frações se mostraram efetivas no controle de XAP, reduzindo o número de lesões em até 73% em comparação ao controle. Anacker (2013), estudando o controle da antracnose na cultura do feijão, pela aplicação de isolados bacterianos, entre eles os usados no presente trabalho, encontrou resultados que indicam que DFs769 apresenta potencial de controle da antracnose quando pulverizadas 48 horas AIP, no entanto não obteve o mesmo êxito quando este foi aplicado 24 horas AIP.

O uso de biocontroladores a base de isolados dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* é bastante difundido, sendo vários os trabalhos que nos trazem resultados positivos do uso desses gêneros no controle de doenças tanto de origem bacteriana como fúngica (SPAGO et al., 2014; SINGH; SIDDIQUI, 2015; GARCIA; ROMEIRO, 2011). Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* estão presentes inclusive em

formulações de produtos comerciais, presentes no Brasil e no exterior (BETTIOL; MORANDI, 2009).

O uso de combinações de microrganismos tem sido descrito como uma estratégia interessante no controle biológico de doenças em plantas. Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* destacam-se nessas combinações, pois apresentam características reconhecidas em controle biológico. A vantagem do uso de combinações é o efeito cumulativo de mecanismos de biocontrole, confrontando o patógeno com diferentes modos de ação. Pressupõe-se que resultados superiores são alcançados com o uso de misturas de isolados biocontroladores, podendo ampliar o espectro de ação sobre diferentes patógenos e cultivares de um mesmo hospedeiro, além de intensificar seu efeito biocontrolador (JACOBSEN; ZIDACK; LARSON, 2004). As duas combinações testadas no presente trabalho consistiram da mistura de bactérias do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, no entanto apenas a CO3 (DFs348+DFs769+DFs831) se destacou dentre os melhores.

Em trabalho realizado com mostarda (*B. campestris*), visando o controle biológico de XCC por meio de isolados rizosféricos de *Pseudomonas* e *Bacillus*, Mishra e Arora (2012), encontraram o melhor resultado em controle quando na combinação de biocontroladores. Segundo os autores, a melhor eficiência no controle se deu pela complementariedade de mecanismos de ação contra o patógeno, onde o isolado de *Pseudomonas* produziu sideróforos, e o isolado de *Bacillus* produziu autolisinas e AHL-lactonases. Sideróforos são importantes moléculas quelantes de ferro, importante na competição por esse nutriente, já as autolisinas são hidrolases que digerem os peptidoglicanos da parede celular de bactérias, AHL-lactonases são enzimas que podem hidrolisar moléculas de sinalização acil-homoserina lactonas (AHL) (importantes na sinalização de quorum-sensing), o que poderia suprimir a expressão de genes de virulência em XCC.

Em contraste aos resultados obtidos no presente estudo, Corrêa (2007), trabalhando com microbiolização de sementes de feijão, em diferentes cultivares, verificou que os maiores percentuais de controle de XAP, nas folhas trifoliadas, foram propiciados pela combinação CO1 (DFS093+DFs769+DFs831) (controle de 66%). O mesmo autor ainda verificou que, dentro de uma gama de 16 isolados de XAP, as maiores médias de controle em relação à testemunha, quando se consideraram severidade, incidência e índice de doença em conjunto para todas as estirpes, foram alcançadas pela combinação CO1 e pelo isolado DFs831, resultando

em 36% e 27% de controle, respectivamente. Corrêa, Schafer e Moura (2014) também encontraram resultados promissores com a CO1, onde essa combinação alcançou um controle efetivo e significativo de todas as doenças avaliadas: mancha angular, murcha do de curtobactério, podridão cinzenta do caule e murcha de fusário. Um fato importante, é que esses trabalhos relatados realizaram o estudo com aplicação dos biocontroladores via semente (microbiolização), em contraste aos ensaios da presente pesquisa, onde os biocontroladores foram aplicados por pulverização foliar, o que pode explicar as diferenças de resultados no controle do CBC. Possivelmente o isolado DFs93, que faz parte da CO1, não se adaptou bem no filoplano, tendo em vista que o mesmo foi isolado do solo, explicando em partes seu fraco desempenho no controle da XAP no presente trabalho. Adicionalmente, em nosso trabalho, o isolado DFs93 aplicado isoladamente via pulverização foliar também não apresentou resultados satisfatórios, o que vem a reforçar a hipótese levantada.

Os resultados do presente trabalho, indicam os isolados DFs769 e DFs513 como potenciais biocontroladores do CBC. Zanatta et al., (2007) avaliando o controle de XAP em sementes de feijão, microbiolizadas com diferentes biocontroladores, obtiveram um alto nível de controle de XAP com os isolados DFs93, DFs513 e DFs769, avaliando a folha cotiledonar, no entanto quando avaliaram os primeiros trifólios, apenas os tratamentos DFs513 e DFs769 mostraram-se eficientes. A aplicação dos biocontroladores no presente ensaio deu-se de maneira diferente, porém verificaram-se resultados semelhantes, onde os tratamentos DFs513 (AACPS) e DFs769 (AACPS, severidade e AACPI) resultaram em controle estável.

Silva et al., (2008), observaram que o isolado DFs769 se destacou dos demais biocontroladores, resultando em inibição *in vitro* de sete isolados patogênicos de XAP, dentre eles o isolado utilizado no presente trabalho (XAP28). Esses resultados evidenciam a antibiose como potencial mecanismo no controle do CBC por meio do biocontrolador DFs769. De fato, o isolado DFs769 foi o tratamento que, de maneira geral, propiciou os menores valores de severidade, AACPS e AACPI no presente ensaio.

De uma maneira geral o melhor momento de aplicação foi em caráter preventivo, em especial para 48 horas AIP, mesmo havendo algum controle após a inoculação do patógeno em determinados casos. O melhor biocontrolador foi o DFs769, o qual apresentou controle significativo na maioria dos casos. Embora

estes resultados sejam promissores, novos estudos precisam ser feitos, em especial esclarecendo os mecanismos envolvidos no biocontrole do XAP pelos biocontroladores estudados.

2.3 Conclusões

Os tratamentos bacterianos DFs769 e CO3 são potenciais biocontroladores do cretamento bacteriano comum do feijão quando aplicados por pulverização foliar.

O efeito biocontrolador proporcionado pelos tratamentos bacterianos DFs769 e CO3 é essencialmente de caráter preventivo, principalmente quando aplicados 48 antes da inoculação do patógeno.

3. CAPÍTULO II – Indução de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* pela pulverização foliar de bactérias

3.1 Introdução

O crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) (XAP), é considerado uma das doenças de maior importância para a cultura do feijão, sendo a principal dentro do grupo das bacterioses (SARTORATO et al., 1996; VALE, COSTA e ZAMBOLIM, 1997), podendo ocasionar perdas de até 70% (DIAZ, 2000).

O controle do CBC é baseado principalmente por medidas preventivas (MOURA; CORRÊA; DENARDIN, 2009), visto que o controle químico tem baixa eficiência (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005), e o controle genético, pelo uso de cultivares resistentes é dificultado em virtude da alta variabilidade de virulência do patógeno (VIEIRA; SOUZA, 2000).

Nesse sentido, surge a necessidade do desenvolvimento de novas alternativas do controle do CBC, como o uso de indutores de resistência. A resistência sistêmica induzida é um estado de maior capacidade defensiva desenvolvido por uma planta, quando adequadamente estimulada, agindo de forma sistêmica (VAN LOON; BAKKER; PIETERSE, 1998). A indução de resistência tem sido demonstrada em diversas espécies de plantas, ocorrendo em resposta ao tratamento com elicitores que podem ser bióticos ou abióticos, dentre os quais pode-se citar os óleos essenciais (RANASINGHE; JAYAWARDENA; ABEYWICKRAMA, 2002), os extratos vegetais (SILVA; PASCHOLATI; BEDENDO, 2007), produtos químicos (VIGO et al., 2012) e microrganismos (PIETERSE, et al., 2014). Nesse contexto, bactérias biocontroladoras são usadas como elicitores bióticos,

desencadeando a resistência sistêmica induzida, conhecida como ISR (Induced Systemic Resistance).

Plantas sob o ataque de patógenos sintetizam um conjunto de proteínas e enzimas relacionadas a defesa (VAN LOON et al., 1997). O papel da indução de resistência é aumentar a expressão dessas enzimas ou fazê-la de forma mais rápida quando na presença do patógeno. Dentre essas enzimas, têm-se as peroxidases e catalases.

Vários estudos têm relatado a indução de resistência sistêmica em plantas pela microbiolização de sementes com bactérias biocontroladoras (PLANCHAMP; GLAUSER; MAUCH-MANI, 2015; FIGUEREDO et al., 2014; BARRETTI et al., 2012; SILVA et al., 2008; SILVA et al., 2009). No entanto, são escassas as informações referentes à indução de resistência por pulverização de biocontroladores em folhas.

Trabalhos anteriores mostraram que isolados de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. quando usados para microbiolizar sementes de feijão têm a capacidade de controlar doenças de maneira inespecífica, com clara separação espacial entre biocontrolador e patógeno (*Pseudocercospora griseola* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*), e mesmo após longo período entre aplicação do biocontrolador e patógeno (CORRÊA; SCHAFER; MOURA, 2014). Estas características, dentre outras, estão presentes quando as plantas estão protegidas pelo mecanismo de indução de resistência (STEINER; SCHÖBECK, 1995). Diante do pressuposto, acredita-se na possibilidade desses isolados atuarem como indutores de resistência.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi identificar o potencial de isolados de bactérias biocontroladoras em induzir ISR em plantas de feijão para o controle de XAP.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Condução dos ensaios

Sementes de feijão da cultivar BRS Valente foram semeadas em vasos com capacidade para 2 Kg, em substrato comercial, mantendo-se duas plantas por vaso. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação com condições de temperatura semicontroladas, e irrigação por microaspersão diariamente. O ensaio foi realizado entre o período de dezembro de 2014 e abril de 2015.

3.2.2 Microrganismos utilizados e sua manutenção

Os isolados bacterianos utilizados (tab. 9) são pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia Vegetal - Departamento de Fitossanidade/UFPel. O patógeno utilizado foi *X. axonopodis* pv. *phaseoli* isolado XAP28, cedido pela Embrapa Clima Temperado. A patogenicidade da bactéria foi previamente testada pelo método de inoculação por tesoura, conforme descrito por Dhingra e Sinclair (1995).

Tabela 8 - Identificação e habitat das bactérias utilizadas isoladamente e em combinação para o biocontrole de doenças do feijão

Isolados	Identificação*	Nichos
DFs348*	<i>Bacillus</i> sp. Cohn	Folha de cebola
DFs513**	<i>Pseudomonas veronii</i> Elomari	Túnica de cebola
DFs769	<i>B. cereus</i> Frankland & Frankland	Vagem de feijão
DFs831*	<i>P. fluorescens</i> Migula	Solo rizosférico
CO3	DFs348+DFs769+DFs831	

*Bactéria utilizada apenas em combinação.

**Determinados por sequenciamento do gene 16S rDNA (dados não publicados).

Os isolados bacterianos foram mantidos em tubos de ensaio contendo o meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) em geladeira a 4°C. A longo prazo foram preservados em óleo, solo e glicerina (DHINGRA E SINCLAIR, 1995). O isolado de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi também preservado em tubos de ensaio contendo meio GYCA (SWINGS; VAUTERIN; KERSTERS, 1993) e em água estéril (ROMEIRO, 2001).

3.2.3 Preparo das suspensões

As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) a 28 °C por 24 horas, no escuro. Para realizar-se a suspensão, adicionou-se solução salina (NaCl 0,85%) e suspenderam-se os crescimentos bacterianos com uma alça de platina. As concentrações das suspensões foram ajustadas em espectrofotômetro para $A_{540} = 0,4$ para as bactérias biocontroladores e $A_{540} = 0,2$ para o patógeno. A combinação de bactérias foi

composta pela mistura em volumes iguais da suspensão de cada isolado individualmente.

3.2.4 Pulverização e inoculação do patógeno

Os tratamentos consistiram na aspersão de suspensões dos tratamentos bacterianos DFs513, DFs769, da combinação CO3 (tab. 9) e testemunha (água estéril).

A aplicação dos biocontroladores foi realizada em folíolos distintos daqueles onde o patógeno foi inoculado, e em dois esquemas: biocontrolador nos folíolos laterais + patógeno no folíolo apical (esquema I); biocontrolador no folíolo apical + patógeno nos folíolos laterais (esquema II), segundo os moldes desenvolvidos por Halfeld-Vieira et al. (2006). Para evitar que a deriva da pulverização dos tratamentos atingisse o folíolo em que se inocularia posteriormente o patógeno, o mesmo foi coberto por papel alumínio durante as aplicações dos biocontroladores (fig. 1 A e B).

A pulverização com os biocontroladores foi realizada em dois períodos em relação à inoculação da XAP, a saber: 72 e 48 horas antes da inoculação do patógeno. A aplicação dos biocontroladores foi realizada após a planta atingir completa expansão da terceira folha trifoliada. A pulverização dos tratamentos foi efetuada por meio de um borrifador manual, até ponto de escorrimento.



Figura 1 - Esquema de aplicação I - biocontrolador nos folíolos laterais + patógeno no folíolo apical (A). Esquema de aplicação II - biocontrolador no folíolo apical + patógeno nos folíolos laterais (B). As folhas cobertas com papel alumínio foram posteriormente (48 ou 72 horas) inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

A inoculação do patógeno foi realizada imergindo-se uma tesoura previamente esterilizada em suspensão de inóculo bacteriano e posteriormente

executando-se dois cortes no folíolo central (esquema I) ou quatro cortes nos folíolos laterais – dois em cada folíolo (esquema II), a partir dos bordos do limbo foliar (DHINGRA; SINCLAIR, 1995), mantendo-se as plantas em câmara úmida por 48 horas após a inoculação do patógeno.

3.2.5 Avaliações

As avaliações de incidência e severidade foram iniciadas ao surgirem os primeiros sintomas em plantas testemunha, o que correspondeu a 96 horas após a inoculação da XAP, realizando-se cinco avaliações com intervalos de dois dias. Para incidência foi considerado o número de cortes nas folhas que apresentavam sintomas do CBC. Para severidade foram atribuídas notas para cada corte, de acordo com escala de Rava (1984) (tab. 10).

Tabela 9 - Escala de notas proposta por Rava (1984) para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* inoculada em folhas de feijão por cortes nos bordos dos folíolos

Notas	Sintomas observados
0	Ausência de sintomas
1	Clorose descontínua nos cortes
2	Clorose contínua nos cortes
3	Clorose e murcha o bordo da folha, sem ultrapassar a nervura lateral
4	Clorose e murcha que ultrapassam a nervura lateral
5	Clorose e murcha até o nível interno dos cortes
6	Clorose avançada e murcha da área cortada

Com os dados de incidência e severidade foram calculadas a área abaixo da curva de progresso da incidência (AACPI) e a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS), de acordo com a equação 1 (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

$$\Sigma = \left(\left(\frac{n_1 + n_2}{2} \right) \times n^{\circ} \text{ de dias} \right) + \dots \left(\left(\frac{n_x + n_x}{2} \right) \times n^{\circ} \text{ de dias} \right), \text{ [eq. 01], onde:}$$

n1: nota do primeiro dia a ser avaliada a severidade;

n2: nota do segundo dia a ser avaliada a severidade;

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

3.2.6 Delineamento experimental e procedimentos estatísticos

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x2 (biocontroladores x período), com quatro repetições. A parcela experimental foi representada por um vaso com duas plantas.

Os dados da AACPI, severidade e AACPS foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade de erro, através do programa Assistat 7.6 (SILVA; AZEVEDO, 2006).

3.3 Resultado e discussão

Em ensaio visando avaliar a ocorrência de indução de resistência ao crestamento bacteriano comum (CBC), observou-se não haver interação significativa entre momento de aplicação e biocontroladores aplicados tanto para AACPI, quanto para severidade e AACPS. O momento de aplicação (72 e 48 horas antes da inoculação do patógeno) também não apresentou significância em relação às três variáveis analisadas. Já os biocontroladores apresentaram diferença significativa para AACPI, severidade e AACPS.

Tabela 10 – Área abaixo da curva de progresso da incidência do crestamento bacteriano comum do feijão em função da aplicação de diferentes biocontroladores pela pulverização foliar, em diferentes momentos de aplicação e em dois esquemas de indução de resistência. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamentos	Esquemas do ensaio	
	Indução I ¹	Indução II ²
Test	697,9 a ³	655,4
513	599,0 ab	616,8
769	472,2 b	515,6
CO3	603,1 ab	522,4
F trat	3,06 *	1,55 ^{ns}
F temp	2,49 ns	1,53 ^{ns}
F int	1,35 ns	0,53 ^{ns}
CV(%)	25,27	27,31

¹Esquema I - biocontrolador nos folíolos laterais + patógeno no folíolo apical. ²Esquema II - biocontrolador no folíolo apical + patógeno nos folíolos laterais. * Significativo a 5% de probabilidade de erro segundo o teste F. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro segundo o teste F. ³Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Em relação à AACPI percebe-se uma reação diferencial entre os esquemas de indução de resistência, uma vez que no esquema IR-II não foi possível se observar diferença significativa entre os tratamentos (tab. 11). Já no esquema IR-I, é possível identificar diferença significativa entre o tratamento DFs769 e a testemunha, uma vez que o mesmo proporcionou reduções da AACPI em relação a testemunha de 44,2%

As avaliações de severidade nos primeiros momentos, primeira e segunda avaliações (96 e 120 horas após inoculação da XAP), não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos, apresentando, porém, nas demais avaliações (tab. 12). No esquema de indução de resistência I (IR-I), na terceira e quarta avaliações, o único tratamento que diferiu da testemunha foi DFs769, apresentando reduções de 45,6% e 42,9%, respectivamente, porém não diferindo dos tratamentos DFs513 e CO3. Já na quinta avaliação de severidade do IR-I, todos os tratamentos bacterianos (DFs513, DFs769 e CO3) apresentaram redução significativa da severidade (48,7%, 41,0% e 43,6%, respectivamente). No esquema de avaliação de indução de resistência II (IR-II) o melhor tratamento manteve-se o DFs769 nas terceira, quarta e quinta avaliações, proporcionando reduções de severidade de (42,9%, 48,9% e 52,5%, respectivamente). Na quinta avaliação de severidade, o tratamento DFs513 também diferiu significativamente da testemunha, apresentando redução de 32,8% de severidade.

Tabela 11 - Severidade do crestamento bacteriano comum do feijão em função da aplicação de diferentes biocontroladores pela pulverização foliar, em diferentes momentos de aplicação e em dois esquemas de indução de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Tratamentos	Esquema I ¹	Esquema II ²
Primeira avaliação		
Test	0,82 ^{ns}	1,04 ^{ns}
513	0,72	0,62
769	0,31	0,44
CO3	0,96	0,61
Segunda avaliação		
Test	1,97 ^{ns}	1,80 ^{ns}
513	1,25	1,63
769	0,92	1,10
CO3	1,61	1,29
Terceira avaliação		
Test	2,39 a ³	2,10 a
513	1,40 ab	1,70 ab
769	1,30 b	1,20 b
CO3	1,80 ab	1,70 ab
Quarta avaliação		
Test	2,80 a	2,59 a
513	1,80 ab	2,03 ab
769	1,60 b	1,34 b
CO3	1,90 ab	2,02 ab
Quinta avaliação		
Test	3,90 a	3,20 a
513	2,00 b	2,15 bc
769	2,30 b	1,52 c
CO3	2,20 b	2,41 ab

¹Esquema I - biocontrolador nos folíolos laterais + patógeno no folíolo apical. ²Esquema II - biocontrolador no folíolo apical + patógeno nos folíolos laterais. ³Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro. ^{ns} Não significativo segundo teste F a 5% de probabilidade de erro.

Analisando os resultados da AACPS (tab. 13), percebe-se que os resultados dos esquemas IR-I e IR-II foram semelhantes, apresentando o mesmo padrão. Também observou-se que apenas o tratamento DFs769 foi capaz de reduzir a AACPS a valores significativamente diferentes da testemunha, embora não tenha diferido dos tratamentos DFs513 e CO3.

No esquema IR-I, o tratamento DFs769 proporcionou redução da AACPS em relação à testemunha de 45,7%. Já no esquema IR-II, o mesmo tratamento reduziu

a AACPS em 44,8%. Os tratamentos DFs513 e CO3, embora não tenham diferido significativamente da testemunha, mostraram uma tendência na redução da variável de 38,8% e 27,9% (IR-I) e de 18,9% e 21,8% (IR-II), respectivamente.

Tabela 12 - Área abaixo da curva de progresso da severidade do crestamento bacteriano comum do feijão em função da aplicação de diferentes biocontroladores pela pulverização foliar, em diferentes momentos de aplicação e em dois esquemas de indução de resistência. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* foi inoculada pela técnica de corte nos bordos dos folíolos. Ensaio realizado em casa de vegetação

Esquemas do ensaio		
Tratamentos	Indução I ¹	Indução II ²
Test	19,04 a ³	16,71 a
513	11,66 ab	13,56 ab
769	10,34 b	9,22 b
CO3	13,73 ab	13,07 ab
F trat	3,06 *	5,08 **
F temp	3,93 ns	1,79 ns
F int	0,71 ns	1,21 ns
CV(%)	17,60	14,71

¹Esquema I - biocontrolador nos folíolos laterais + patógeno no folíolo apical. ²Esquema II - biocontrolador no folíolo apical + patógeno nos folíolos laterais. As folhas cobertas com papel alumínio foram posteriormente (48 ou 72 horas) inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. * Significativo a 5% de probabilidade de erro segundo o teste F. ** Significativo a 1% de probabilidade de erro segundo o teste F. ³Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si segundo o teste Tukey a 5% de probabilidade de erro.

De maneira geral, pode-se observar que o tratamento mais promissor dentro dos diferentes biocontroladores testados foi o DFs769 (*B. cereus*), uma vez que o mesmo proporcionou reduções na AACPI, severidade e AACPS.

Trabalhos anteriores têm mostrado que o biocontrolador DFs769 apresenta capacidade de inibição de XAP *in vitro* (SILVA et al., 2008), grande diversidade metabólica, bem como produção de sideróforos (CORRÊA, 2010; RODRIGUEZ, 2015), o que sugere que o mesmo possa atuar por meio do mecanismo de antibiose e competição. No presente trabalho verificou-se que esse biocontrolador é também um indutor de ISR, uma vez que ocorreu uma redução evidente de doença, com base nas variáveis analisadas, mesmo havendo uma separação espacial entre biocontroladores e patógeno.

Vários trabalhos têm mostrado que isolados de *B. cereus*, tem potencial como elicitores biológicos de ISR. A exemplo, têm-se trabalho de Kuhn e Pascholati (2010), em que os autores avaliaram o efeito protetor de um isolado de *B. cereus*, bem

como de acibenzolar-S-metil, e os custos adaptativos da indução de resistência a XAP em feijão, e observaram que *B. cereus* proporcionou uma redução de 37% na severidade em relação à testemunha. Silva et al., (2004) também identificaram um isolado de *B. cereus* como sendo elicitador de indução de resistência a um amplo número de patógenos em tomateiro (*Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola*, *Stemphylium solani*, *Oidium lycopersici* e *X. campestris* pv. *vesicatoria*). Trabalho realizado por Halfeld-Vieira et al., (2006) também vem reforçar o potencial de isolados de *B. cereus* na indução de resistência. Os autores conseguiram diminuir consideravelmente a severidade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* em tomate com a pulverização de *B. cereus*, além de verificar ausência de antibiose, o aumento significativo dos níveis de peroxidases e a sistemicidade da proteção, sugerindo que o biocontrolador utilizado atuou como indutor de ISR.

Curiosamente, a combinação CO3, não diferiu na maioria das análises da testemunha. Como a CO3 possui na sua formulação o isolado DFs769, esperar-se-ia que a mesma apresentasse efeito indutor de ISR maior ou igual ao isolado DFs769 individualmente, visto que o isolado DF769 apresentou-se como evidente indutor de ISR. É possível que, por levar apenas um terço na sua mistura, esse efeito tenha sido menos pronunciado. É sabido que um dos pressupostos para haver indução de resistência é ausência de relação entre magnitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado (STEINER; SHÖNBECK, 1995), no entanto, é evidente que existe uma quantidade mínima necessária para desencadear a ISR, sendo assim supõe-se que a quantidade do isolado necessária para o desencadeamento da ISR foi insuficiente na CO3.

Jetiyanona e Kloepper (2002), em trabalho testando diferentes isolados do gênero *Bacillus*, utilizados em mistura e individualmente em microbiolização de sementes, mostraram que um isolado aplicado individualmente e quatro misturas foram capazes de reduzir os sintomas de tombamento (*Rhizoctonia solani*), murcha (*Ralstonia solanacearum*), cucumber mosaic vírus (CMV) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), em *Brassica chinensis* var. *parachinensis*, *Lycopersicon esculentum*, *Cucumis sativus* e *Capsicum annuum* var. *acuminatum*, respectivamente. Estes resultados sugerem que determinados isolados de *Bacillus* bem como misturas dos mesmos podem provocar resistência sistêmica induzida a doenças fúngicas, bacterianas, e virais.

O melhor tratamento foi DFs769, reduzindo a AACPI, severidade e AACPS. Como havia uma separação espacial entre biocontrolador e patógeno fica evidente que a redução da doença se deu em função da indução de resistência. De uma maneira geral, indiferente do folíolo que recebeu o patógeno ou o biocontrolador, o efeito do controle do CBC foi similar, mesmo havendo diferenças entre proporção de biocontrolador x patógeno nos dois esquemas utilizados. No entanto, trabalhos futuros devem ser desenvolvidos, visando estabelecer eficiência e intervalo de aplicações do biocontrolador em condições de campo.

3.4 Conclusões

O biocontrolador DFs769 atua como elicitador da indução de resistência contra o cretamento bacteriano comum do feijão.

A resistência induzida por DFs769 em feijão ocorre independente do folíolo inoculado.

A resistência induzida ocorre tanto quando se aplica DFs769, 48 antes quanto 72 horas antes da inoculação do patógeno.

4. CONCLUSÕES

Os tratamentos bacterianos DFs769 e CO3 são potenciais biocontroladores do crestamento bacteriano comum do feijão quando aplicados por pulverização foliar, em caráter preventivo, em especial quando aplicados 48 antes da inoculação do patógeno.

O biocontrolador DFs769 atua como elicitador da indução de resistência contra o crestamento bacteriano comum do feijão, tanto quando aplicado as 48 antes quanto 72 horas antes da inoculação do patógeno.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O crestamento bacteriano comum do feijão (CBC) é uma importante doença, causando danos econômicos em todas regiões produtoras desse grão. O controle químico do CBC é ineficiente e o controle genético, atualmente, é muito limitado, devido à carência de cultivares resistentes a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (XAP) disponíveis no mercado. A carência de métodos de controle eficientes torna o controle desta bacteriose extremamente difícil, baseando-se principalmente em medidas preventivas. Sendo assim, o desenvolvimento de novos métodos de controle desse patógeno torna-se fundamental e nesse sentido, o controle biológico ganha importante papel no manejo desse patossistema.

Trabalhos anteriores já indicavam o potencial biocontrole do CBC pelos microrganismos testados neste trabalho, quando aplicados via microbiolização de sementes. O presente estudo abriu novas possibilidades, mostrando que o isolado DFs769 e a combinação CO3 são capazes de proporcionar o biocontrole do CBC também quando aplicados por pulverização foliar, com efeito preventivo e até mesmo curativo. A possibilidade da aplicação do biocontrolador por pulverização foliar traz uma maior praticidade e flexibilidade no seu emprego, uma vez que sua aplicação via sementes nem sempre é possível, seja por limitações tecnológicas ou operacionais ao nível de campo. A aplicação do agente biocontrolador pela pulverização é mais prática, podendo ser facilmente adaptada à mecanização e realizada frequentemente, além de poder ser associada ao tratamento de sementes e outras práticas de controle.

Neste trabalho não se comparou a eficiência entre aplicações em semente e pulverização foliar, no entanto, é importante lembrar que biocontroladores aplicados na semente podem não sobreviver durante todo o ciclo da cultura, ao passo que a aplicação foliar pode ser realizada em qualquer momento, podendo ser feita no

período mais crítico em relação ao CBC. É verdade que no mesófilo foliar os microrganismos estão mais sujeitos aos raios ultravioleta e variações de temperatura e umidade, porém aplicações podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias. Em comparação, biocontroladores aplicados na semente estão menos sujeitos a essas intempéries, porém, estão diante de um número muito mais diversificado e abundante de microrganismos presentes no solo, já adaptados a esse ambiente, com os quais eles terão que competir desde a semeadura até o final do ciclo da cultura. Visto esta diferença entre rizosfera e filoplano, seria interessante o estudo do efeito sinérgico entre o uso desses biocontroladores inoculados via semente adicionalmente à pulverização foliar.

Os resultados deste estudo mostram o potencial da pulverização foliar dos isolados DFs769 e da combinação CO3 no controle do CBC, no entanto são necessários estudos visando determinar o número e intervalo entre aplicações dos tratamentos bacterianos, bem como sua compatibilidade com agrotóxicos, além de esclarecer a ocorrência ou não de especificidade desses biocontroladores em relação a diferentes genótipos de feijão e sua efetividade contra diferentes isolados de XAP. Não menos importante é determinar o desempenho desses biocontroladores em ensaios a campo em condições de cultivo comercial, avaliando não só o controle do CBC mas também a produtividade final da cultura. Por fim, é indispensável desenvolver formulações com esses biocontroladores analisando a eficácia e viabilidade destes quando formulados e armazenados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT Agrofit: Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/lap_ing_ativo_lista_cons>. Acesso em: 20/04/2015.]

AHMADZADEH, M.; TEHRANI, A. S. Evaluation of fluorescent pseudomonads for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. **Biological Control**, v.48, p.101-107, 2009.

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.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A.; SOUZA, J. T. Combination of endophytic bacteria and resistant cultivars improves control of Ralstonia wilt of tomato. **Australasian Plant Pathology**, v.41, p.189–195, 2012.

BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. **Biocontrole de Doenças de Plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 2009.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorim, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**, São Paulo: Agronômica Ceres, v.2, p. 333-349, 2005.

CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. (eds). **Principais doenças fúngicas para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, 178p. 1999.

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**, Botucatu, Edição Especial 01, p.104-117, 2014.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA ARROZ E FEIJÃO (CNPAF). EMBRAPA. Disponível em: <<http://www.embrapa.org/cnpaf/feijão>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Conab. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_09_09_00_21_boletim_graos_janeiro_2015.pdf> Acesso em 15 de fevereiro de 2015.

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

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

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

CORRÊA, B.O.; MOURA, A.B.; GOMES, C.B.; SOMAVILLA, L.; ROCHA, D.J.A.; ANTUNES, I.F. Potencial da microbiolização de sementes de feijão com rizobactérias para o controle de nematoide das galhas. **Nematropica**, v.42, n.2, 2012.

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

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. (1995). **Basic plant pathology methods**. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, 434p.

DIAS, P.P.; BERBARA, R.L.L.; FERNANDES, M.C. A. Controle de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* por biopreparados de isolados de *Trichoderma* spp. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.4, p.258-262, 2013.

DIAZ, C.G. **Avaliação de danos causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2000. Tese (Doutorado)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

DÍAZ, C.G., BASSANEZI, R.B., GODOY, C.V., LOPES, D.B.; BERGAMIN FILHO, A. Quantificação do efeito do crestamento bacteriano comum na eficiência

fotossintética e na produção do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p.71-76, 2001.

FIGUEREDO, M.S.; TONELLI, M.L.; TAURIAN, T.; ANGELINI, J.; IBAÑEZ, F.; VALETTI, L.; MUÑOZ, V.; ANZUAY, M.S.; LUDUEÑA, L.; FABRA, A. Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. **Journal Bioscience**, v.39, n.5, p.877–885, 2014.

GARCIA, F.A.O. **Biocaracterização de procariotas como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotores de crescimento em feijoeiro**. 132f. 2008. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

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

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

HALFELD-VIEIRA, B.A.; VIEIRA, J.R.; ROMEIRO, R.S.; SILVA, H.S.A.; BARACATPEREIRA, M.C. Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1247-1252, 2006.

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

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

JACOBSEN, B.J.; ZIDACK, N.K.; LARSON, B.J. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases. **Phytopathology**, v.94, p.1272-1275, 2004.

JETIYANONA, K.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. **Biological Control**, v.24, p.285–291, 2002.

JEYALAKSHMI, C.; MADHIAZHAGAN, K.; RETTINASSABABADY, C. Effect of different methods of application of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial leaf blight under direct sown rice. **Journal of Biopesticides**, v.3, n.2, p.487 – 488, 2010.

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

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

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. 2007. 140f. Tese (Doutorado em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. São Paulo.

KUHN, O.J.; PASCHOLATI, S.F. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.107-114, 2010.

KUMSINGKAEW, S.; AKARAPISAN, A. Efficiency of *Bacillus subtilis* EPB14 as biocontrol to control bacterial leaf blight of anthurium. **Journal of Agricultural Technology**. v.10, n.3, p.755-766, 2014.

LANNA FILHO, R., ROMEIRO, R.S.; ALVES, E. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. **Pesquisa Agropecuária brasileira**. v.45, n.12, p.1381-1387, 2011.

MAPA. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Perfil do feijão no Brasil**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao/saiba-mais>>. Acesso em: 20/04/2015.

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

MISHRA, S.; ARORA, N.K. Evaluation of rhizospheric *Pseudomonas* and *Bacillus* as biocontrol tool for *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.693-702, 2012.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S.; LIMA, J.S.; MEYER, A.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; SARCINELLI, P.N.; BATISTA, D.F.; EGLER, M.; FARIA, M.V.C.; ARAÚJO, A.J.; KUBOTA, A.H.; SOARES, M.O.; ALVES, S.R.; MOURA, C.M.; CURI, R. Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.2, p.299-311, 2002.

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

NAUE, C.R.; ROCHA, D.J.A.; MOURA, A.B. Biological control of tomato bacterial spot by seed microbiolization. **Tropical Plant Pathology**, v.39, n.5, p.413-416, 2014.

PEDRO, E.A.S.; HAKAKAVA, R; LUCON, C.M.M.; GUZZO, S.D. Promoção do crescimento do feijoeiro e controle da antracnose por *Trichoderma* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, n.11, p.1589-1595, 2012.

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

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

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

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

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

RODRIGUEZ, D.P. Potencial da microbiolização de sementes para biocontrole do mofo branco no feijão. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) – Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas.

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

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.

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

SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, v.29, p.288–295, 2004.

SILVA, E.G. **Biocontrole do cretamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro oriundas de sementes microbiolizadas por bactérias**. 2004. 55f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Departamento de Fitossanidade. Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. RS, 2004.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. A new version of the Assistat - statistical assistance software. In: World congress on computers in agriculture, 4, Orlando – FL - USA: **Anais...** Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, p.393-396, 2006.

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

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

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

SINGH, N.; SIDDIQUI, Z. A. Effects of *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and *Aspergillus awamori* on the wilt-leaf spot disease complex of tomato. **Phytoparasitica**, v.43, p.61–75, 2015.

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

STEINER, U.; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. (Ed.). **Induced resistance to disease in plants: developments in plant pathology**. Dordrech: Kluwer Academic Pub., 1995.

SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; KERSTERS, K. The bacterium *Xanthomonas*. In: SWINGS, J.G.; CIVEROLO, E.L. (eds.). **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p.121-156.

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

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

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, v.36, p.453–83, 1998.

VIEIRA, A.A.H.; SOUZA, R.M. de. Virulência de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua variante *fuscans*. **Ciência Agrotecnologia**, v.24 (ed. especial), p.94-102, 2000.

VIEIRA-JUNIOR, J.R. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. 2005. 140f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

VIGO, S.C., MARINGONI, A.C., CÂMARA, R.C., LIMA, G.P.P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o crestamento bacteriano comum do feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.4, p.293-304, 2009.

VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CAMARA, R.C.C.; LIMA, G.P.P. Avaliação de pyraclostrobin e acibenzolar-S-methyl sobre o crestamento bacteriano comum do feijão-vagem. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.1, p.167-174, 2012.

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

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