



SAMUEL JULIO MARTINS

**CONTROLE DA MURCHA-DE-
CURTOBACTERIUM DO FEIJOEIRO COM
ISOLADOS DE BACTÉRIAS
ENDOSPOROGÊNICAS**

LAVRAS - MG

2012

SAMUEL JULIO MARTINS

**CONTROLE DA MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM DO FEIJOEIRO
COM ISOLADOS DE BACTÉRIAS ENDOSPOROGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle Biológico, para obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

LAVRAS – MG

2012

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Martins, Samuel Júlio.

Controle da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro com isolados
de bactérias endosporogênicas / Samuel Júlio Martins. – Lavras:
UFLA, 2012.

55 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Flávio Henrique Vasconcelos Medeiros.

Bibliografia.

1. Feijão. 2. Tratamento de sementes. 3. Proteção de plantas. 4.
Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*. 5. Controle
biológico. 6. Rizobactérias. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 632.32

SAMUEL JULIO MARTINS

**CONTROLE DA MURCHA-DE-CURTOBACTERIUM DO FEIJOEIRO
COM ISOLADOS DE BACTÉRIAS ENDOSPOROGÊNICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, área de concentração em Controle Biológico, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de fevereiro de 2012.

Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

Dr. Hudson Teixeira EPAMIG

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

Orientador

LAVRAS – MG

2012

A Deus, que me permitiu sonhar e trabalhar pela realização deste sonho.

Aos meus pais, Célia e Antônio, razão de minha existência, pelo amor e apoio na minha formação acadêmica.

Aos meus segundos pais, Juraci e Jacinto, pelo incentivo na busca de um futuro melhor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Fitopatologia (DFP), pela oportunidade de desenvolver o mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros, pela orientação, ensinamentos, confiança e amizade.

Ao Professores Ricardo Magela de Souza e Mário Lúcio Vilela de Resende por disponibilizarem os seus respectivos laboratórios e equipamentos para a execução dos experimentos desse trabalho.

Aos estagiários: Alexandre, Beatriz, Francielly, Lídia, Priscila, Thais, pela ajuda no trabalho.

Aos amigos do departamento: Aurivan, Willian, Gustavo, Ana Maria, Ana Beatriz, Flávia, Daniel, Henrique, Helon, Stefanny, Dayane, Melina, pela convivência.

Ao Pedro, pela ajuda nas análises bioquímicas.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização deste trabalho.

RESUMO

Investigações em casa-de-vegetação foram conduzidas para determinar a eficácia de rizobactérias, isolados de *Paenibacillus lentimorbus* (MEN2) e *Bacillus subtilis* (ALB629, UFLA285 e UFLA168*) no controle da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro, na promoção de crescimento e nas respostas bioquímicas da planta na presença ou não do patógeno, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Também foi avaliada a ação das rizobactérias em duas temperaturas no controle da doença, colonização da planta, utilização de diferentes fontes de C e N e antibiose. Sementes cultivar Pérola inoculada artificialmente com Cff e tratadas com rizobactérias além de apresentarem uma redução na severidade da murcha-de-curtobacterium (39,97 a 66,63%) aumentaram a taxa de crescimento relativo (TCR), o peso seco da parte aérea (PSA) e da raiz (PSR) das plantas. Em relação à promoção de crescimento, o tratamento de sementes com as rizobactérias na ausência do patógeno não resultou em diferenças quanto às variáveis TCR, PSA, PSR, índice de velocidade de emergência (IVE) e estande final (EF). Para avaliar as respostas bioquímicas sementes de feijoeiro foram tratadas com as rizobactérias (ALB629 ou UFLA285) na presença ou não de Cff e semeadas. Ambas as rizobactérias e o tratamento com acibenzolar-S-methy (ASM) promoveram aumento na atividade da PAL e teor de fenóis solúveis totais na ausência do patógeno. Na presença de Cff, ALB629 induziu o acúmulo no teor de fenóis. UFLA285 e ALB629 na ausência do patógeno promoveram acúmulo de lignina enquanto que na presença do patógeno UFLA285 e ASM proporcionaram esse acúmulo. Em relação à POX, as rizobactérias não induziram acúmulo superior à testemunha, seja para plantas inoculadas ou não. Para o estudo de colonização da planta, o mutante ALB629^{Rif} foi selecionado da população selvagem de ALB629 e usado no tratamento de sementes artificialmente infectadas com Cff sob 20 °C e 30 °C. Verificou-se que ALB629^{Rif} reduziu a severidade da doença em ambas as temperaturas e foi eficiente colonizador do feijoeiro, entretanto essa colonização foi dependente da temperatura de cultivo. Quanto à utilização de diferentes fontes de C e N verificou-se que a ALB629 cresceu melhor na temperatura 30 °C, exceto no meio contendo o aspartato onde não se verificou diferenças. O estudo de antibiose revelou que todas as rizobactérias testadas (ALB629, UFLA285, UFLA168* e MEN2) inibiram o crescimento *in vitro* de Cff em ambas temperaturas 20 °C e 30 °C. Nos demais tratamentos (ASM, Água e MCF) Cff cresceu normalmente. No entanto, não foi verificada diferenças no diâmetro de inibição da Cff pelas rizobactérias nas duas temperaturas testadas. O uso de rizobactérias para o controle da murcha-de-curtobacterium em feijoeiro é discutido.

Palavras-chave: Tratamento de sementes. Proteção de plantas. Controle biológico. Rizobactérias. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

ABSTRACT

Investigations under greenhouse conditions were conducted to determine the effectiveness of rhizobacteria *Paenibacillus lentimorbus* (MEN2) and *Bacillus subtilis* (ALB629, UFLA285, and UFLA168*) strains in the control of bacterial wilt in common bean, plant growth-promotion, and biochemical responses of the plant in the presence or not of the pathogen, *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*). It was also assessed the rhizobacteria biocontrol at the two temperatures, plant colonization, use of different sources of C and N and antibiosis. Bean seeds cv. Pérola artificially inoculated with *Cff* and treated with rhizobacteria showed a reduction in the bacterial wilt severity (39.97 to 66.63%) as well as an increase in the relative growth index (RGI), shoot dry weight (SDW), and root (RDW) of the plants. In regard to growth promotion, the seed treatment with rhizobacteria in the absence of the pathogen did not result in significant difference in relation to the variables: RGI, SDW, RDW, emergence speed index (SEI), and percentage seedling emergence (PSE). To evaluate the biochemical responses bean seeds were treated with rhizobacteria (ALB629 or UFLA285) in the presence or absence of *Cff* and sowed. Both rhizobacteria and the ASM treatment promoted an increase in PAL activity and total soluble phenolics without inoculation. Upon inoculation ALB629 promoted an accumulation in the phenolics content. UFLA285 and ALB629 without inoculation promoted a lignin accumulation while in the presence of the pathogen UFLA285 and ASM induced that accumulation. In relation to POX, the rhizobacteria did not induce an accumulation higher than the control, both for plants inoculated or not. In the plant colonization study, a mutant (ALB629^{Rif}) was risen from the wild ALB629 population and used in the treatment of artificially infected seeds with *Cff* at 20 °C and 30 °C. It was found that ALB629^{Rif} reduced the disease severity in both temperatures and it was an efficient colonizer of bean plants, however that colonization was dependent on the growth temperature. Regarding the use of different C and N sources it was found that the ALB629 grew better in the temperature 30 °C, except for medium containing the aspartate, where differences were not identified. The antibiosis study revealed that all tested rhizobacteria (ALB629, UFLA285, UFLA168*, and MEN2) inhibited the *Cff* growth in vitro at both temperatures 20 °C and 30 °C. The other treatments (ASM, Water, and MCF), *Cff* grew normally. However, it was not identified differences in diameter of the *Cff* inhibition by rhizobacteria at the two temperatures tested but all inhibited the pathogen growth. The rhizobacteria use for the control of bacterial wilt is discussed.

Keywords: Seed treatment. Plants protection. Biological control. Rhizobacteria. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	10
3	REVISÃO DE LITERATURA	12
3.1	Murcha-de-curtobacterium	12
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Isolamento de Cff	18
4.2	Isolados de rizobactérias	18
4.3	Tratamento de sementes com rizobactérias	19
4.4	Rizobactérias na promoção de crescimento em feijoeiro	20
4.5	Rizobactérias no controle da murcha-de-curtobacterium	22
4.6	Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa	23
4.6.1	Proteínas totais	24
4.6.2	Peroxidasas de guaiacol	24
4.6.3	Fenilalanina amônia-liase	24
4.6.4	Lignina solúvel	25
4.6.5	Determinação de fenóis solúveis totais	26
4.7	Colonização das plantas pelas rizobactérias em diferentes temperaturas	27
4.7.1	Obtenção do mutante resistente a antibiótico e avaliação de sua estabilidade	27
4.7.2	Tratamento de sementes e recuperação da bactéria	28
4.8	Utilização de diferentes fontes de C e N por rizobactérias em diferentes temperaturas	29
4.9	Bioensaio para antibiose in vitro a 20 °C e 30 °C	30
4.10	Análise estatística	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1	Rizobactérias na promoção de crescimento	32
5.2	Análise nutricional	32
5.3	Rizobactérias no controle da murcha-de-curtobacterium	33
5.4	Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa	37
5.5	Estudo da colonização das plantas pelas rizobactérias	41
5.6	Utilização de diferentes fontes de C e N por rizobactérias em diferentes temperaturas	44
5.7	Antibiose	46
6	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa de cultivo mais difundido no mundo, tendo grande importância econômica e social para o Brasil (Chueire et al., 2003). A cultura está implantada em praticamente todo o território nacional, ocupando lugar de destaque na constituição da dieta do brasileiro, por ser, reconhecidamente, excelente fonte de proteínas e possuir bom conteúdo de carboidratos complexos, ferro (Vieira et al., 2006), ácido fólico (fonte de vitamina B), zinco, magnésio e potássio (CIAT, 2002).

Segundo dados do CONAB (2012), o Brasil é o maior produtor e consumidor mundial, com a produção na safra de 2010/2011 de 3.767,5 mil toneladas e uma área plantada de 4.005,4 mil hectares. Minas Gerais é o segundo maior produtor do país contribuindo com 401,3 mil toneladas o que representa 16% da produtividade nacional.

A cultura, tradicionalmente conduzida por pequenos agricultores na safra de verão nos últimos anos, adquiriu alta rentabilidade, passando a ser cultivada em diversas épocas do ano, principalmente em cultivos irrigados no inverno, por grandes produtores e alta tecnologia (Uesugi et al., 2003). Entretanto, apesar de todo o desenvolvimento tecnológico a cultura é considerada de risco econômico, devido à alta suscetibilidade às doenças e pragas e pouca tolerância à seca e ao frio. No Brasil, as doenças constituem-se em uma das principais causas da sua baixa produtividade, podendo causar, dependendo das condições de ambiente, perdas totais ou, inviabilizar determinadas áreas para o cultivo (Vieira et al., 2006). Além disso, existe uma tradição do uso de sementes próprias (Herbes et al., 2008), que é um dos grandes entraves ao incremento da produtividade devido à disseminação de doenças. Em Minas Gerais, por exemplo, apenas 10% da área são cultivadas com sementes fiscalizadas (Sena et al., 2008). Entre as

doenças que afetam o feijoeiro as de origem bacteriana tem causado sérios prejuízos.

Bactérias fitopatogênicas podem estar associadas às sementes, tanto as infectando como as infestando. Como não há um padrão típico, pode uma mesma bactéria estar associada às sementes nas duas formas, concomitantemente. Portanto, a semente é o principal veículo de disseminação e introdução de bactérias fitopatogênicas em novas áreas de cultivo, sendo essa, a principal forma de transmissão de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges, 1922; 1926; Collins & Jones, 1983) (*Cff*), agente da murcha-de-curtobacterium no Brasil. A doença foi detectada pela primeira vez no país em 1995 (Maringoni & Rosa, 1997) e, mesmo sendo recente, tem trazido grande preocupação aos pesquisadores e produtores em vários estados brasileiros (Leite et al., 2001; Maringoni, 2002, Uesugi et al., 2003; Theodoro e Maringoni, 2006).

Apesar disso, até o momento não existe nenhuma cultivar imune à bactéria, embora já se tenha encontrado algumas cultivares com diferentes graus de tolerância ou resistência (Hsieh et al., 2005; Souza et al., 2006; Krause et al., 2009; Valentini et al., 2010). Em relação ao controle químico, não há registro até o momento de produtos químicos registrados contra o patógeno.

Por outro lado, as rizobactérias apresentam um potencial para serem usadas no manejo de doenças bacterianas e sua aplicação via tratamento de sementes pode erradicar e/ou controlar o progresso da doença.

2 OBJETIVOS

Determinar o potencial de isolados de rizobactérias como promotoras de crescimento de plantas de feijão e no controle da murcha-de-curtobacterium através do tratamento de sementes;

Determinar respostas bioquímicas do feijoeiro tratado com rizobactérias na presença ou não de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*;

Estudar o crescimento de uma rizobactéria selecionada cultivada em diferentes fontes de C e N, colonização do feijoeiro e controle da doença a 20 °C e 30 °C.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Murcha-de-curtobacterium

No Brasil há registros de ocorrência de diferentes bacterioses no feijoeiro: crestamento bacteriano comum, crestamento bacteriano aureolado, fogo-selvagem e murcha-de-curtobacterium que tem como agentes etiológicos respectivamente, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (= *X. campestris* pv. *phaseoli*) (Robbs, 1954); *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* (= *P. syringae* pv. *phaseolicola*) (Costa e Paradela, 1972); *P. syringae* pv. *tabaci* (Ribeiro et al., 1980) e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) (Maringoni & Rosa, 1997). Destas, apenas o crestamento bacteriano comum e, recentemente, a murcha-de-curtobacterium possui importância no país.

A murcha-de-curtobacterium causada por *Cff* é considerada uma das doenças bacterianas mais prejudiciais à cultura. A doença que atualmente se encontra amplamente difundida (CABI/EPPO, 1999), ainda é considerada quarentenária em muitos países (Hsieh et al., 2004). O patógeno é capaz de causar severas perdas na produção como já ocorreu nos Estados Unidos (Thomas & Graham 1952; Dowson 1957; Coyne & Schuster 1979; Venette et al. 1995), onde há relatos de até 90% de queda na produção (Hedges, 1926). País este onde a doença foi detectada pela primeira vez em Dakota do Sul (Hedges 1922), sendo posteriormente constatada em outros estados como Michigan, Virgínia, Mayrand, Montana e Columbia (Hedges, 1922; 1926; Dowson, 1957; Coyne & Schuster, 1979; Venette et al., 1995). A doença também foi detectada em alguns países europeus, bem como na Austrália, Canadá, México e Colômbia (COSAVE, 2003). Desde o seu surgimento, em 1922, a *Cff* foi considerada um dos patógenos mais importantes do feijoeiro, causando perdas totais em alguns anos (COSAVE, 2003).

No Brasil, *Cff* era considerada praga quarentenária, sendo que em 1995 sua ocorrência foi relatada no estado de São Paulo por Maringoni & Rosa (1997) e, a partir daí, tornou-se de importância emergente para o cultivo do feijoeiro em diferentes regiões. Apesar de ser um patógeno relativamente recente no país, está se disseminando rapidamente para as regiões produtoras de feijão. Há relatos de até 46,7% de queda na produção (Miranda Filho, 2006). Atualmente, há relatos de que a *Cff* tem ocorrido com frequência em lavouras de feijoeiro nos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Distrito Federal e Goiás causando grandes problemas à cultura (Leite et al., 2001; Maringoni, 2002, Uesugi et al., 2003; Theodoro e Maringoni, 2006). Na (Figura 1) pode se observar a distribuição geográfica de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* no mundo.

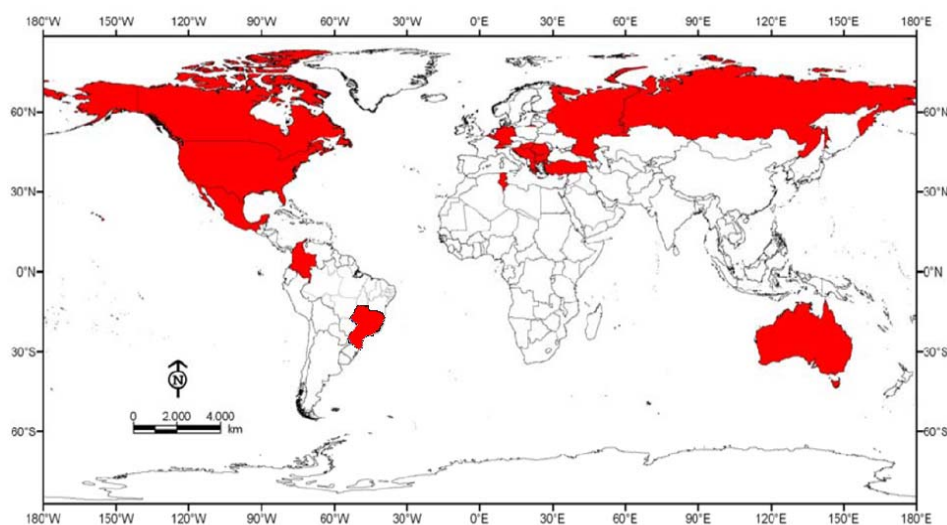


Figura 1 Modificado de Distribuição geográfica de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Fonte: BRADBURY, 1986; COMMONWEALT, 1992; MARINGONI e ROSA, 1997)

No Estado de São Paulo, tem-se o conhecimento da ocorrência sistemática de focos de epidemias da murcha-de-curtobacterium em lavouras conduzidas na região do Vale do Paranapanema (Maringoni, 2000). Em Santa Catarina nas safras 2002/03 e 2003/04, Theodoro & Maringoni (2006) verificaram que a doença esteve presente nos municípios de Campos Novos, Faxinal dos Guedes, Guatambu, Ipuacu, Ponte Serrada e Tigrinhos. Em cultivos comerciais no Distrito Federal (PAD – DF), Cabeceiras (Goiás) e Buritis (Minas Gerais), a presença da bactéria foi constatada em 100% das propriedades levantadas nos anos de 2004 e 2005 (Miranda Filho, 2006).

Segundo Maringoni & Rosa (1997), a murcha-de-curtobacterium pode estar ocorrendo há muito tempo na cultura do feijão no Brasil e, devido à similaridade de sintomas com a murcha-de-fusarium, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*, ter sido confundida e não percebida anteriormente. De acordo com Hedges (1922, 1926), em alguns casos, pode-se também confundir as colônias amarelas de *Cff* com as de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* o que dificulta o correto diagnóstico da doença, importante etapa para o controle.

Segundo Saettler, (1991), a murcha-de-curtobacterium é favorecida por temperaturas acima de 32 °C e o maior desenvolvimento da doença ocorre a 37 °C.

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* é uma bactéria gram-positiva e as colônias apresentam formato circular, bordos lisos, planas ou levemente convexas e de aspecto brilhante, com coloração variando de amarela a laranja, conforme as características descritas para o gênero (Romeiro, 2005). Segundo Alam et al. (1996), a cor típica das colônias de alguns patógenos pode ou não ser influenciada pelos solutos osmóticos nos diferentes potenciais hídricos, concordando com os resultados obtidos por Deuner (2007), em que a cor original de cada isolado de *Cff* não foi alterada. No caso de sementes contaminadas internamente, as mesmas podem apresentar coloração amarelada,

laranja ou púrpura, como consequência do crescimento bacteriano e se tornarem enrugadas (Tegli et al., 2002).

A principal forma de disseminação de *Cff* é por sementes contaminadas oriundas de plantas doentes, não sendo disseminada por chuva e água de irrigação por ficar internamente nos tecidos vasculares. No entanto, dissemina-se rapidamente após chuva de granizo devido aos ferimentos causados. A bactéria pode penetrar na ausência de chuvas, não sendo observada a penetração via estômato.

A doença inicia-se com a seca de folíolos apicais, com posterior amarelecimento e murcha total das folhas (Bianchini et al., 2000). Uma vez na planta, *Cff* coloniza os tecidos vasculares (Hedge, 1926) causando murcha e flacidez das folhas. Ocasionalmente, esse sintoma típico de murcha pode progredir para manchas amareladas e posteriormente necróticas, muito semelhantes ao crestamento bacteriano comum causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (EPPO/CABI, 1996), no entanto a lesão marginal é mais irregular em *Cff*, (Figura 2).

Em geral, a planta inteira morre antes de apresentar o primeiro grupo de folhas trifoliadas totalmente desenvolvidas.



Figura 2 Sintomas de murcha-de-curtobacterium em feijoeiro

Na literatura existem poucos relatos sobre práticas de controle dessa doença. Trabalhos foram desenvolvidos visando selecionar fontes de resistência em feijoeiro à *Cff*, no final da década de 1950 e início da de 60, relatado por Deuner (2007). Apesar disso, até o momento não existe nenhuma cultivar imune à bactéria, embora já se tenha encontrado algumas cultivares com diferentes graus de tolerância ou resistência (Maringoni 2002; Hsieh et al., 2005; Souza et al., 2006; Krause et al., 2009). Em relação ao controle químico, não há registro de nenhum produto contra o patógeno.

Além de sobreviver em semente mantida à temperatura ambiente por até 24 anos (Burkholder, 1995), a bactéria também é capaz de sobreviver no solo. Miranda Filho (2006) verificou que pelo menos durante dez meses, a bactéria se manteve viável e foi capaz de infectar as plantas de feijoeiro em uma área de cultivo de feijão sob pivô central com alta ocorrência da bacteriose.

Portanto, as medidas de controle até o momento recomendadas para a essa doença são o uso de sementes sadias (Herbes et al., 2008; Venette et al., 1995).

Para assegurar a sanidade de sementes, além dos testes de detecção, é importante se determinar formas de tratamento que assegurem a introdução da bactéria na área. Para tanto, os tratamentos físico, químico e biológico podem ser usados.

Até o presente, não há nenhum tratamento físico ou químico de sementes recomendado para feijão para erradicação desta bactéria, mas existem relatos de tratamento biológico com rizobactérias com potencial para ser usado no controle desta bacteriose (Hsieh et al. 2005; Huang et al. 2007).

Rizobactérias estão entre as estratégias de controle de doenças potencialmente úteis (Medeiros et al., 2009a). Uma vez que as rizobactérias colonizam os tecidos da planta, o controle biológico de patógenos pode ser resultante da combinação de vários mecanismos, incluindo competição por

nutrientes e espaço, antibiose e indução de resistência (Ramamoorthy et al. 2001). Estas bactérias potencialmente controlam a murcha-de-curtobacterium em feijão. Até o momento, o isolado endofítico LRC 8311 de *Pantoea agglomerans* (Hsieh et al. 2005) e *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* R21 (Huang et al. 2007), reduziram efetivamente a incidência e severidade da murcha-de-curtobacterium e promoveram aumento no crescimento das mudas de feijão.

Ambos os trabalhos de prospecção de agentes de controle biológico da murcha-de-curtobacterium não resultaram em produtos disponíveis aos agricultores e, portanto ainda não são uma tecnologia recomendável para o manejo da doença. O uso de bactérias endosporogênicas para o manejo de doenças tem mais chances de resultar em um produto disponível aos agricultores pela maior facilidade de sobrevivência sob condições ambientais adversas e maior facilidade na obtenção de um bioproduto (Medeiros, 2009b).

Dentre as condições ambientais desafiantes para o patógeno, estão as diferentes temperaturas em que o feijão pode ser cultivado. Em Minas Gerais, por exemplo, o feijão pode ser cultivado em três épocas diferentes: águas (outubro a dezembro), seca (janeiro a março) e inverno (maio a julho). Um tratamento de sementes com agentes bióticos tem que ser capaz de manter a eficiência de controle independente da condição de plantio predominante.

O crescimento das rizobactérias e a eficiência no controle também podem variar em função da fonte de carbono e nitrogênio e sua combinação com a temperatura. Essa variação pode estar relacionada à dinâmica de crescimento em cada fonte, à temperatura ou uma combinação de ambos (Nihorimbere, et al., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolamento de *Cff*

O isolado de *Cff* utilizado neste estudo pertencente à coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia de Plantas da Universidade Federal de Lavras e é proveniente do Estado de Santa Catarina (Deuner, 2007). Esse isolado se encontra preservado em peptona glicerol a -80 °C (Lazo & Gabriel, 1987) e em material vegetal herborizado. Na realização dos ensaios, o isolado foi repicado para meio 523 (Kado e Heskett, 1970) pelo método de estrias paralelas e incubado a 28 °C, por 48h. Em seguida, as células foram colhidas da superfície do meio e transferidas para meio 523 (Kado e Heskett, 1970) líquido e cultivado por 24 h em mesa agitadora orbital a 150 rpm e 28 °C. Desse meio líquido, 100 µL da suspensão bacteriana do isolado foram plaqueados em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20 mL do meio de cultura CNS (Schaad et al., 2001) acrescido de manitol na proporção de 30 g/L de meio, espalhadas com alça de Drigalski esterilizada e incubados por 48 h a 28 °C. Decorrido o período de incubação, procedeu-se a inoculação com restrição hídrica, em condições assépticas, das sementes desinfestadas, colocando-se 50 sementes por placa. As sementes permanecem em contato com o inóculo por 24 horas, em BOD, à temperatura de 28 °C.

4.2 Isolados de rizobactérias

Os isolados selecionados para o controle da murcha-de-curtobacterium via tratamento de sementes infectadas por *Cff* foram: *Bacillus subtilis* ALB629 (Mars Center for Cocoa Science, Itajuípe, BA) endofítico de caule de cacau, *Paenibacillus lentimorbus* MEN2 (Universidade Federal Rural de Recife,

Recife, PE - Rosa Mariano) endofítico de melão e *Bacillus subtilis* UFLA285, UFLA168*, UFLA246, UFLA373, UFLA116 e UFLA29 (Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG - Ricardo M. Souza) endofíticos de algodoeiro das principais regiões produtoras de algodão do Brasil (Medeiros et al., 2008; Medeiros, 2009b). Estes isolados foram previamente selecionados para o controle de doenças do algodoeiro (Medeiros, 2009b). Esses 8 isolados foram submetidos a um *screening* sendo que 4 se destacaram no controle da doença: ALB629, MEN2 UFLA285 e UFLA168*. Portanto os melhores agentes foram novamente testados contra a doença e na promoção de crescimento.

4.3 Tratamento de sementes com rizobactérias

Ao fim do período de exposição das sementes ao inóculo de *Cff* pela técnica de restrição hídrica, foi realizado o tratamento das sementes com as respectivas rizobactérias e água e oxiclureto de cobre como testemunhas. Os isolados selecionados e preservados em peptona glicerol a -80 °C (Lazo & Gabriel, 1987) foram transferidos para o meio de cultura ágar nutriente pelo método de estrias paralelas e incubados por 48 h a 28 °C. Após o período de incubação as células foram colhidas da superfície do meio, transferidas para o meio caldo-nutriente e cultivadas por 48 h em mesa agitadora orbital a 150 rpm e 28 °C. Em seguida, a concentração de endósporos foi ajustada em câmara de Neubauer a 10^8 endósporos/mL para o tratamento de sementes. As bactérias endosporogênicas possuem considerável plasticidade fenotípica, garantida pelo crescimento desde 15 °C até 60 °C e formação de endósporos que lhes permitem sobrevivência além destes limites de temperatura, na escassez de nutrientes ou água (Lamanna, 1940) e crescimento rápido eventualmente sob condições anaeróbicas (Schisler et al., 2004). Sementes da cultivar Pérola foram microbiolizadas com os antagonistas na dosagem de 2 mL/g de semente,

previamente desinfestadas (álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 05% por 10 min), secas ao ar à temperatura ambiente por 12 horas.

4.4 Rizobactérias na promoção de crescimento em feijoeiro

Dentre as variáveis para determinar o efeito de rizobactérias sobre o desenvolvimento do feijoeiro foram analisadas germinação, crescimento, acúmulo de matéria seca e análise foliar.

Os ensaios foram realizados em casa-de-vegetação da Universidade Federal de Lavras, DFP/UFLA, município de Lavras, Minas Gerais, Brasil (915m altitude média, 21°13'34''S e 44°58'31''O).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso com 4 repetições por tratamento, sendo cada repetição representada por 10 plantas/vaso. Sementes da cultivar Pérola foram microbiolizadas como descrito anteriormente. Em seguida foram semeadas em vasos de 5 litros contendo substrato preparado com terra e areia na proporção de (2:1), respectivamente. Cada ensaio foi repetido por três vezes.

Dois variáveis foram consideradas para medir o efeito das rizobactérias na germinação: o índice de velocidade de emergência (IVE) e o estande final (EF).

Para o IVE, diariamente a partir do 5º e até o 12º dia após o plantio (DAP) avaliou-se a germinação. A partir destes dados foi calculado o IVE pelo somatório dos quocientes resultantes entre o número total de plantas emergidas a cada dia e o número de dias decorridos da semeadura (Teixeira & Machado, 2003). No último período considerado (12 DAP) avaliou-se o estande final para o cálculo da porcentagem germinação. Ambas as variáveis (IVE e germinação) foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Aos 12, 15, 18, 21, 24 DAP realizou-se a avaliação de altura de plantas, medindo-as a partir da inserção do cotilédono até a gema apical. A partir dos dados de altura de plantas foi calculada a taxa de crescimento relativo (TCR) pela fórmula:

$$TCR = \frac{\sum (\ln P_2 - \ln P_1)}{t_2 - t_1}, \text{ onde:}$$

Ln é o logaritmo natural; P2 e P1 representam os parâmetro de altura obtidos nos tempos t2 (tempo final) e t1 (tempo inicial), respectivamente. Segundo (Guimarães, 1994).

No 24º DAP, todas as plantas foram cortadas, as raízes extraídas e separadas da parte aérea. Ambas as partes de cada uma das plantas foram armazenadas em sacos de papel e em seguida levadas à estufa onde permaneceram a 70 °C por 72 h até peso constante. Em seguida, pesou-se a parte aérea e a raiz obtendo-se respectivamente, as variáveis: peso seco da parte aérea (PSA) e peso seco da raiz (PSR) as quais foram submetidas à análise de variância e, para efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Uma vez registrado o PSA, foi determinado o conteúdo de macro e micronutrientes para cada tratamento. As amostras de plantas secas foram enviadas ao Laboratório de Química da UFLA. Os dados de teor de nutrientes foram submetidos à análise de variância e, para efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para verificar a consistência dos resultados, todos os ensaios foram repetidos por três vezes.

4.5 Rizobactérias no controle da murcha-de-curtobacterium

Os isolados de rizobactérias descritos anteriormente foram testados em condições de casa-de-vegetação para o controle da murcha-de-curtobacterium e como promotores de crescimento na presença do patógeno. As sementes foram microbiolizadas com os antagonistas (10^8 endósporos/mL) citados anteriormente na dosagem de 2 mL/g de semente previamente inoculada com *Cff* como descrito anteriormente.

A emergência das plântulas foi avaliada diariamente e os dados usados para cálculo do IVE e EF, semelhante ao descrito anteriormente.

Aos 12, 15, 18, 21, 24 DAP foi realizada a avaliação da altura das plantas e da severidade da murcha-de-curtobacterium de acordo com a escala de Hsieh et al., (2003), onde 0 = sem sintomas, 1 = murcha em uma das folhas primárias, 2 = murcha em ambas folhas primárias mas não nos primeiros trifólios, 3 = murcha nos primeiros trifólios, 4 = morte de plântulas depois do desenvolvimento das folhas primárias e 5 = não emergência de plântulas ou morte de plântulas antes do desenvolvimento das folhas primárias. Para a análise do biocontrole os dados de severidade da doença foram transformados de acordo com o índice de McKinney (1923) para cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (Shaner & Finney, 1977). Para a avaliação da promoção de crescimento foram calculados o índice de velocidade de emergência (IVE), estande final (EF), taxa de crescimento relativo (TCR), peso seco da parte aérea (PSA) e do peso da raiz (PSR). O PSA e o PSR foram obtidos no 24 DAP conforme descrito anteriormente. Os experimentos foram repetidos três vezes para verificar a consistência de resultados.

4.6 Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa

Dois outros ensaios foram montados em casa-de-vegetação, um ensaio com o objetivo de avaliar a resposta bioquímica da planta de feijão cultivar Pérola ao ser tratada com rizobactérias através do tratamento de sementes, e um segundo com o objetivo de caracterizar os mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa da planta contra a murcha-de-curtobacterium.

Quatro tratamentos compuseram o primeiro experimento: sementes tratadas com acibenzolar-s-metil (ASM) uma vez que esse produto é considerado padrão na indução de resistência de plantas; sementes microbiolizadas com as rizobactérias (ALB629 ou UFLA285) uma vez que estas rizobactérias mostraram-se promissoras nos testes realizados e compondo o experimento o tratamento testemunha (sementes tratadas com água). Para o segundo experimento os tratamentos foram os mesmos anteriores, com a diferença que as sementes foram antes inoculadas com a *Cff* através da técnica de restrição hídrica já descrita anteriormente.

Em ambos os experimentos o delineamento utilizado foi em blocos casualizados com três repetições e três plantas por parcela por tempo de coleta. Os tempos de coleta corresponderam a quatro estádios fenológicos da planta de feijão: V1 – emergência (cotilédones fora do solo), V2 – folhas primárias (par de folhas primárias abertas), V3 – primeira folha trifoliolada (aparecimento das folhas trifolioladas) e V4 – terceira folha trifoliolada (folhas trifolioladas totalmente expandidas). As plantas apenas eram amostradas quando atingiam o estágio fenológico pré-determinado.

Em cada coleta, todas as folhas das três plantas por parcela foram cortadas, envolvidas em papel alumínio, identificadas, mergulhadas em nitrogênio líquido e, após o congelamento, acondicionadas em sacos plásticos e

armazenadas em freezer, a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o preparo do material para as análises bioquímicas. As respostas bioquímicas de defesa analisadas em ambos os experimentos foram: peroxidases (POX), fenilalanina amônia-liase (PAL) e os teores de fenóis solúveis totais e de lignina. Para a análise dos fenóis solúveis totais e lignina o tempo de coleta foi apenas no último estágio fenológico (folhas trifolioladas totalmente expandidas).

4.6.1 Proteínas totais

A concentração de proteína solúvel total foi aferida com a utilização de uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) conforme ensaio de Bradford (1976).

4.6.2 Peroxidases de guaiacol

A atividade de peroxidases de guaiacol (POX) foi determinada pela adição de $5\text{ }\mu\text{L}$ do extrato enzimático, ajustado para $200\text{ }\mu\text{L}$ de solução contendo $100\text{ }\mu\text{L}$ de acetato de sódio 50 mM pH 5,2, $20\text{ }\mu\text{L}$ de guaiacol 20 mM , $20\text{ }\mu\text{L}$ peróxido de hidrogênio 60 mM e $55\text{ }\mu\text{L}$ de água destilada. Após incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 10 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, a 480 nm (Urbanek; Kuzniak-Gebarowska; Herka, 1991). Uma unidade POX foi expressa com variação de 1 OD_{480} por miligrama de proteína solúvel por minuto – UA $(\text{mg P min})^{-1}$.

4.6.3 Fenilalanina amônia-liase

A atividade da fenilalanina amônia-liase (PAL) foi medida de acordo com Mori, Sakurai & Sakuta (2001). Uma mistura de reação foi preparada

adicionando 100 μL de tampão 100 mM Tris-HCl (pH 8,8) e 50 μL de 40 mM de fenilalanina e 20 μL do extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada por 30 min a 37 °C e a atividade da enzima paralisada com a adição de 30 μL de HCl 6N. A fenilalanina foi adicionada aos controles após a incubação e adição do HCl. A mistura de ensaio foi centrifugada a 1450 g por 15 min a 4 °C, a absorbância do sobrenadante (180 μL) medida em 280 nm e a quantidade de ácido trans-cinâmico formado foi avaliada por comparação com a curva padrão (0,01-0,10 mg de ácido trans-cinâmico mL^{-1}). Os valores foram expressos como unidade de atividade por miligrama de proteína por minuto.

4.6.4 Lignina solúvel

Para a análise de lignina solúvel, os tecidos foliares dos tratamentos referentes à última coleta foram triturados em nitrogênio líquido, com almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas por 16 horas em liofilizador L101. Uma alíquota de 30 mg foi transferida para tubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida protegida da luz à temperatura ambiente por 15 horas. A suspensão foi centrifugada, a 12.000 g, por 5 minutos e o sobrenadante descartado. Para lavar o material, ao resíduo sólido foram adicionados 1,5 mL de água destilada, homogeneizado e centrifugado a 12.000 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o resíduo seco à temperatura ambiente, por 15 horas. Posteriormente, acrescentou-se 1,5 mL de solução de ácido tioglicólico:HCl 2N (1:10). Em seguida, agitaram-se suavemente os tubos para hidratar o resíduo e estes foram colocados em banho-maria em fervura por 4 horas.

Posteriormente, os tubos foram centrifugados, a 12.000 g por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado com 1,5 mL de água destilada e novamente centrifugado, a 12.000 g, por 5 minutos, a 4 °C.

A seguir, o sobrenadante foi descartado e o sedimentado ressuspense em 1,5 mL de NaOH 0,5 M e mantido por 15 horas à temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 5 minutos, a 4 °C e o sobrenadante transferido para o novo microtubo, ao qual foram adicionados 200 µL de HCl concentrado. A suspensão obtida foi mantida em temperatura ambiente, por 4 horas, para permitir a precipitação da lignina ligada ao ácido tioglicólico.

Em seguida, a mistura foi centrifugada a 12.000 g, por 5 minutos, a 4 °C, o sobrenadante descartado e o sedimentado ressuspense em 2 mL de NaOH 0,5 M.

A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro a 280 nm e os valores calculados com base na curva de lignina e expressos em µg de lignina solúvel por miligrama de massa seca (Doster; Bostock, 1988).

4.6.5 Determinação de fenóis solúveis totais

Uma alíquota de 30 mg das amostras liofilizadas provenientes da última coleta foram colocadas em tubo de 2 mL, homogeneizada com 1,5 mL de metanol a 80% e mantida por 15 horas protegido da luz à temperatura ambiente. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 5 minutos e, uma alíquota de 15 µL do sobrenadante (extrato metanólico) foram recuperadas e nessa alíquota foram adicionadas 15 µL do metanol a 80%, 30 µL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,25 N, por 5 minutos, 30 µL de Na₂CO₃ 1 M, por 10 minutos e então diluído com 1,1 mL de água destilada, à temperatura ambiente, por uma hora. Os valores de absorbância desta reação foram determinados, a 725 nm, em espectrofotômetro e calculados com base em curva de catecol. Os compostos fenólicos totais foram expressos em equivalente µg de catecol por miligrama de massa seca (Spanos; Wrolstad, 1990).

4.7 Colonização das plantas pelas rizobactérias em diferentes temperaturas

Este experimento teve por objetivo avaliar as plantas de feijoeiro quanto à colonização pelas respectivas rizobactérias usadas no tratamento de sementes contra a murcha-de-curtobacterium. Estes ensaios foram realizados em câmara de crescimento e em casa de vegetação respectivamente nas temperaturas de 20 °C e 30 °C.

4.7.1 Obtenção do mutante resistente a antibiótico e avaliação de sua estabilidade

O mutante ALB629^{Rif} resistente ao antibiótico rifampicina (100 ppm) foi obtido a partir do cultivo do isolado selvagem *Bacillus subtilis* ALB629 em placas de Petri contendo o meio ágar nutriente. Escolheu-se esse isolado uma vez que o mesmo foi o que melhor resultado apresentou nos experimentos realizados no controle da murcha-de-curtobacterium. A cada repicagem do isolado ALB629 era adicionado ao meio de cultura com doses crescentes do antibiótico rifampicina até que se chegasse à resistência na concentração desejada (100 ppm) obtendo-se assim o mutante ALB629^{Rif}.

Com o intuito de avaliar a capacidade de crescimento do mutante em relação à estirpe selvagem ambos foram submetidos à curva de crescimento. Nos tempos de 8, 16 e 24 horas os dois isolados eram repicados para Erlenmeyers contendo meio caldo - nutriente (MCF) acrescidos ou não do antibiótico (100ppm), respectivamente para o mutante e para a estirpe selvagem, e então levados para crescerem em mesa agitadora orbital a 150 rpm e 28 °C. Ao final desse período, os isolados foram diluídos em série em todos com NaCl até a diluição 10⁻⁸ e então 100 µL das 4 últimas diluições foram plaqueadas em

placas de Petri contendo meio ágar nutriente. Após 24 h foram contados o número de colônias encontradas em cada diluição.

4.7.2 Tratamento de sementes e recuperação da bactéria

Sementes de feijão foram tratadas com o mutante de *B. subtilis* ALB629^{Rif}, inoculado com *Cff* e semeados, conforme procedimentos descritos anteriormente.

Para a quantificação, partes da planta passíveis de serem colonizadas pelo antagonista, como folhas, caules e raízes foram amostradas aos 24 DAP, desinfetadas com álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio 05% por 10 min e então maceradas com bastão de vidro em solução salina a 0,85% e diluídos em série. Em seguida, 100 µL do extrato bruto e das diluições 10⁻¹ a 10⁻⁵ obtidos foram pipetados em placa de Petri contendo meio ágar nutriente com rifampicina (100 ppm), espalhados com alça de Drigalski esterilizada e as placas incubadas em BOD a 28 °C. Após 48 h, avaliou-se a presença de rizobactérias nas plantas indiretamente através do número de colônias encontradas em cada diluição da suspensão.

Para certificar o mutante (ALB629^{Rif}) quanto à manutenção da capacidade de controle da doença em feijoeiro conferida pelo isolado selvagem (ALB629) foram obtidos a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

Cada um dos ensaios nas duas diferentes temperaturas foi repetido duas vezes para a confirmação dos resultados.

4.8 Utilização de diferentes fontes de C e N por rizobactérias em diferentes temperaturas

Neste experimento buscou-se estimar a eficiência com que as rizobactérias utilizam diferentes fontes nutricionais sob diferentes temperaturas. Para isso, *Bacillus* ALB629 foi avaliado quanto à capacidade de crescer às temperaturas de 20 °C e 30 °C ao longo dos tempos de 12, 24, 36 e 48 horas. Foram 4 os meios de cultura utilizados para estimar esse crescimento, os quais diferiram entre si pelos seguintes substratos: glicose e citrato de sódio, ambos utilizados como fontes diferentes de C e como fontes de N, aspartato e glutamato. Esses substratos foram utilizados na concentração de 10 g L⁻¹, exceto para glutamato em que se utilizou 15 g L⁻¹. Esses foram adicionados a uma solução concentrada composta por MgSO₄.7H₂O 0,5 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1,0 g L⁻¹, KCl 0,5 g L⁻¹, extrato de levedura 1,0 g L⁻¹, FeSO₄(7H₂O) 1,2 mg L⁻¹, MnSO₄(H₂O) 0,4 mg L⁻¹, CuSO₄ 1,6 mg L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 1g L⁻¹. O pH dos 4 diferentes meios foi ajustado para 7 +/- 0,2 com NaOH ou HCl 0,1 N antes de serem esterilizados, conforme descrito por Nihorimbere et al., (2009).

A parcela experimental consistiu-se de um tubo de ensaio com 3 mL do meio em estudo. Cada parcela continha 3 repetições x tempo x temperatura.

Para avaliar então o crescimento do ALB629 nos referidos meios, o mesmo foi cultivado em meio MCF líquido por 48 h a 28 °C sob agitação. A cada 12 h, durante 48 horas uma alíquota de 150 µL da suspensão dos antagonistas era transferida para cada tubo que continha 3 mL dos meios descritos acima. Após cada transferência os tubos foram colocados nas temperaturas de 20 °C e 30 °C em duas mesas agitadoras orbital diferentes, ambas a 150 rpm. Assim, transcorrido 48 h após a primeira transferência havia 3 tubos com os tempos de crescimento em estudo: 12, 24, 36, 48 horas respectivamente para as temperaturas de 20 °C e 30 °C. Neste tempo, foi

realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de luz no $\lambda = 600$ de todos os tubos.

4.9 Bioensaio para antibiose in vitro a 20 °C e 30 °C

Para a verificação da antibiose o inóculo de *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* foi cultivado em meio líquido por 48 h e então 100 μ L da suspensão foram plaqueados e espalhados por toda a placa contendo meio de cultura CNS (Schaad et al., 2001), como já descrito no item 4.1.

Paralelamente ao cultivo de *Cff* foram também cultivados os antagonistas os quais foram os mesmos testados para o controle da murcha-de-curtobacterium: MEN2, ALB629, UFLA285 e UFLA168*. Estes foram cultivados por 48 h em meio MCF (extrato de levedura 13,8 g/l; K_2HPO_4 2,5 g/l; KH_2PO_4 anidro 1,0 g/l; NaCl 2,5 g/l; Sacarose 6,5 g/l; Sulfato de Magnésio 0,25 g/l; Sulfato de Manganês 0,1 g/l) como já descrito anteriormente. Para compor esse ensaio foram também acrescidos os tratamentos ASM, Água (testemunha) e o meio utilizado para se cultivar as rizobactérias (MCF). Após a suspensão da *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* ser espalhada em meio de cultura CNS (Schaad et al., 2001), uma gota de 10 μ L de cada uma das suspensões descritas foram pipetadas em pontos aleatórios da placa com meio descrito contendo a suspensão de *Cff*. Foram feitas 6 placas para cada temperatura testada (20 °C e 30 °C). Essas placas então foram levadas a BOD com a respectiva temperatura e ao final de 48h foram medidos os diâmetro de inibição a *Cff*.

4.10 Análise estatística

A análise estatística dos dados do bioensaio foi realizada através do programa Sisvar, versão 5.1 (Build 72) Copyright Daniel Furtado Ferreira 1999-

2007, em delineamento em blocos casualizados (DBC) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rizobactérias na promoção de crescimento

Não houve diferença estatística pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$) entre as quatro rizobactérias testadas em relação à testemunha quanto à promoção de crescimento avaliado através das variáveis TCR, EF, IVE, PSA e PSR. Portanto as rizobactérias testadas não foram efetivas como promotoras de crescimento. Provavelmente, até o tempo de coleta das plantas, 24 DAP não foram suficientes para que houvesse diferenças entre os tratamentos quanto aos nutrientes analisados.

5.2 Análise nutricional

Não houve efeito significativo entre os tratamentos com as rizobactérias ($P < 0,001$) quando comparados ao controle negativo (plantas não tratadas com as rizobactérias) em relação a todos os nutrientes analisados (Tabela 1).

Tabela 1 Tratamento de sementes de feijão com rizobactérias e avaliação nutricional através da análise foliar. Média de dois ensaios, 4 repetições/ensaio e 10 plantas/repetição

TM ^z	MEN2	ALB629	UFLA285	UFLA168*	OC ^y	CN ^u
N	4.79ab	4.64abc	4.91a	4.41c	4.46bc	4.82a
P	0.143a	0.130ab	0.136ab	0.130ab	0.113b	0.137ab
K	2.57a	2.34ab	2.34ab	2.38ab	2.15b	2.34ab
Ca	1.02a	0.95a	0.93a	0.88a	0.63b	0.95a
Mg	0.27a	0.26a	0.26a	0.25a	0.25a	0.25a
S	0.37a	0.33ab	0.35ab	0.34ab	0.30b	0.36ab
B	46.22ab	55.77a	56.05a	51.87a	33.70b	58.7a
Cu	6.22b	6.17b	6.12b	5.74b	9.80a	5.8b
Mn	121.15a	106.63a	113.57a	92.14a	117.30a	105.47a
Zn	22.66a	21.90a	21.02a	19.65a	20.87a	20.91a
Fe	431.69ab	503.66a	452.21ab	436.21ab	324.07b	423.42ab

^zTratamentos

^yOxicloreto de Cobre

^xCN, controle negativo (sementes não tratadas com rizobactérias)

Apenas o tratamento com o oxiclóreto de cobre via tratamento de sementes induziu o acúmulo de cobre e a redução nos teores de boro e cálcio, o que pode explicar a fitotoxidez observada nos tratamentos. O cobre embora não seja um produto recomendado para o tratamento de sementes, mas sim para uso na parte aérea para controle de outras bacterioses (Agrofit, 2012), foi testado no tratamento de sementes para erradicação de *Cff*, como uma testemunha positiva. O produto surpreendentemente garante uma maior taxa de crescimento na ausência do patógeno, mas causa um provável desbalanço nutricional em feijoeiro, não sendo, portanto recomendado para ser usado na erradicação de *Cff*.

5.3 Rizobactérias no controle da murcha-de-curtobacterium

Analisaram-se as rizobactérias no controle da doença bem como na promoção de crescimento na presença do patógeno. As variáveis anteriormente analisadas no item 4.5 também foram analisadas na presença do patógeno e submetidas à análise de variância (ANAVA) e a discriminação da variação entre os tratamentos feita pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade. Os dados da AACPD, PSA, PSR e AF sofreram transformação do tipo raiz quadrada de $(x+1)$, e os dados de IVE e TCR, transformação do tipo arco seno da raiz quadrada de $(x/100)$ como descrito por (Banzatto & Kronka, 2006) uma vez que as pressuposições da análise de variância não foram satisfeitas.

Pela análise dos resultados da AACPD pôde-se constatar que houve efeito significativo entre os tratamentos ($p < 0,001$), mas não em relação ao tempo ($p = 0,09$). Quando as médias foram comparadas, verificou-se que os 4 isolados de rizobactérias testados controlaram a doença com reduções na AACPD variando entre 39,97 e 66,63% com melhor resultado para *Bacillus subtilis* ALB629 e em alguns casos para *B. subtilis* UFLA285 (Gráfico 1 e Figura 3).

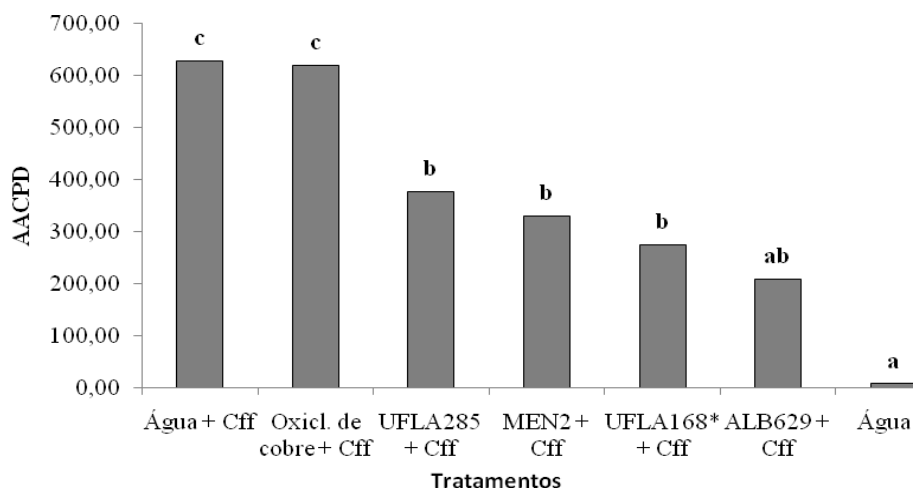


Gráfico 1 Efeito do tratamento de sementes com rizobactérias, oxiclreto de cobre e água na redução da Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença (AACPD) na presença ou ausência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Média de três ensaios, 4 repetições/ensaio e 10 plantas/repetições. CV = 23.72

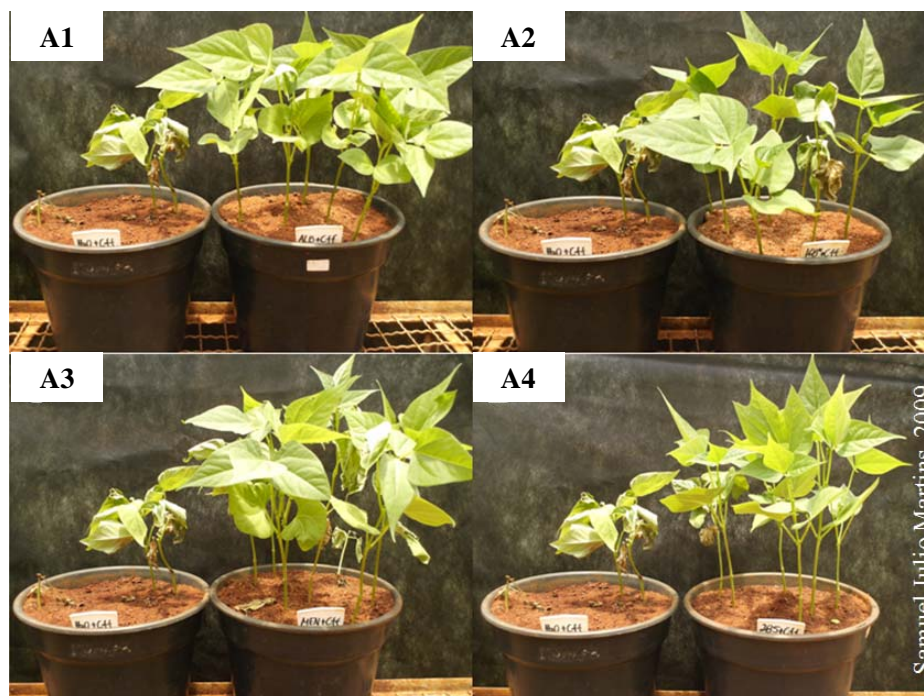


Figura 3 Rizobactérias aplicadas no controle da murcha-de-curtobacterium de feijoeiro pelo tratamento de sementes. A1) Plantas testemunhas contaminadas com *Cff* e plantas contaminadas com *Cff* tratadas com *Bacillus subtilis* ALB629; A2) Plantas testemunhas contaminadas com *Cff* e plantas contaminadas com *Cff* e tratadas com *B. subtilis* UFLA168*; A3) Plantas testemunhas contaminadas com *Cff* plantas contaminadas com *Cff* e tratadas com *Paenibacillus lentimorbus* MEN2; A4) Plantas testemunhas contaminadas com *Cff* plantas contaminadas com *Cff* tratadas com *B. subtilis* UFLA285

Todos os isolados de rizobactérias na presença de *Cff* aumentaram o PSA e os isolados UFLA168* e ALB629 aumentaram a TCR, entretanto nenhum deles apresentou resposta ao e PSR, IVE ou mesmo ao EF em relação à testemunha pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$) (Gráficos 2 e 3). O oxiclreto de cobre embora tenha aumentado a TCR em relação à testemunha inoculada (Gráfico 3), não foi efetivo no controle da murcha-de-curtobacterium (Gráfico 1) nem mesmo no aumento do IVE. Já o PSA e PSR diferiu dos tratamentos com

rizobactérias ($p < 0,027$). Quanto ao EF, oxicleto de cobre apresentou a menor média (44,68%) quando comparado pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade.

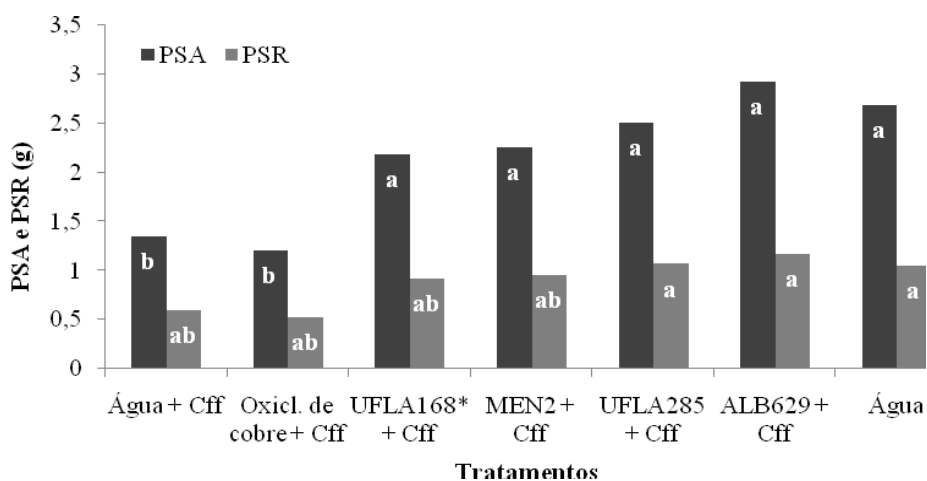


Gráfico 2 Efeito de isolados endosporogênicos no tratamento de sementes infectadas artificialmente por *Cff* e na promoção de crescimento. As variáveis avaliadas foram o peso seco da parte aérea (PSA), CV = 26.35 e peso seco da raiz (PSR), CV = 21.72 Médias com a mesma letra não difere significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Média de três ensaios, 4 repetições/ensaio e 10 plantas/repetições

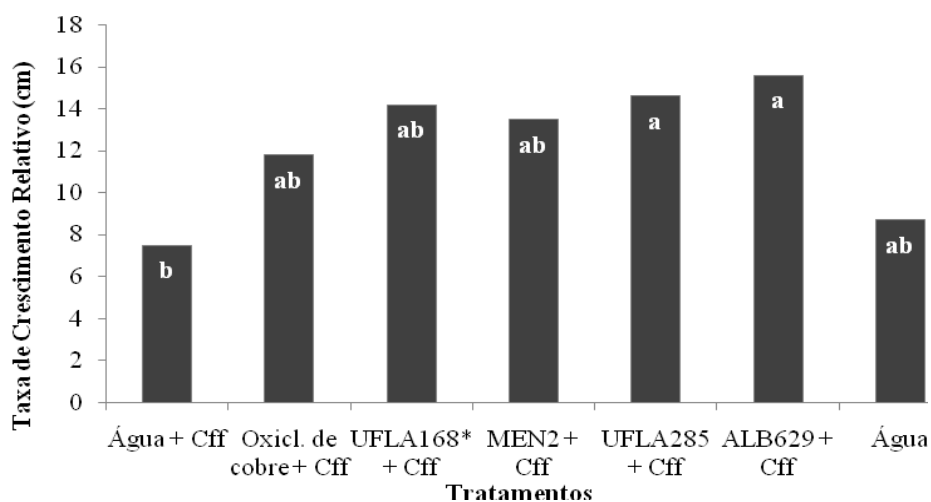


Gráfico 3 Efeito de isolados endosporogênicos no tratamento de sementes infectadas artificialmente por *Cff* na promoção de crescimento avaliado através da taxa de crescimento relativo (TCR). Médias com a mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($P \leq 0.05$). Média de três ensaios, 4 repetições/ensaio e 10 plantas/repetição

5.4 Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa

Para a PAL, observa-se um aumento na atividade para todos os tratamentos, na ausência do patógeno (Gráfico 4A). No entanto, na presença do patógeno, a enzima aumenta em atividade para os dois primeiros estágios e em seguida decresce não se observando diferenças entre as plantas tratadas e não tratadas (Gráfico 4B) a partir do 3 estágio de coleta.

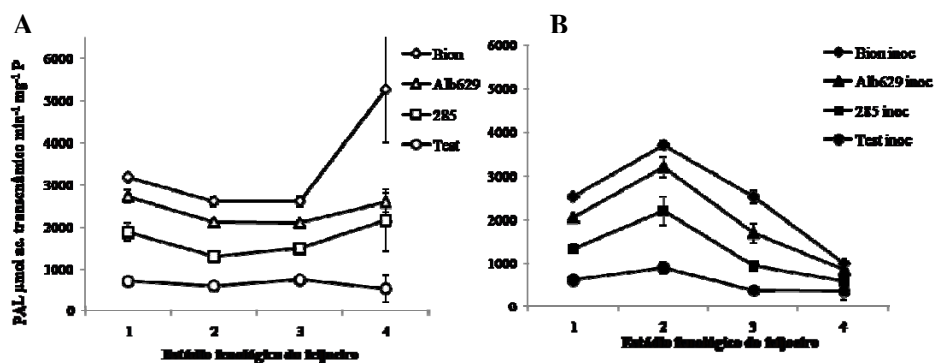


Gráfico 4 Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em plantas de feijoeiro. Em A e B, gráficos da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL). Os valores 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente os estádios de germinação (folhas cotiledonares expandidas num ângulo de 90°), aparecimento das folhas trifoliolada e folhas trifoliolada totalmente expandidas. Barras representam erro padrão da média.

O segundo estágio é também aquele onde foram observados os primeiros sintomas da doença (dados não apresentados). Este fato é uma possível indicação da ocorrência de bloqueio de respostas de defesa em feijoeiro susceptível mediado pela *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, conforme já demonstrado para outros patossistemas (Cooper, 2010). A PAL é a enzima que converte a fenilalanina a ácido cinâmico e esta representa a via ainda indiferenciada da rota dos fenilpropanóides (Zabala et al., 2006). Um dos produtos finais desta rota é o acúmulo de fenóis que por sua vez culmina com o depósito de lignina sobre a parede celular (Buchanan et al., 2000).

Foram também medidos os fenóis totais e lignina. O teor de fenóis totais é significativamente maior na ausência do patógeno (Gráfico 5A), mas em sua presença, apenas o ALB629 induz a um acúmulo significativo destas moléculas (Gráfico 5B).

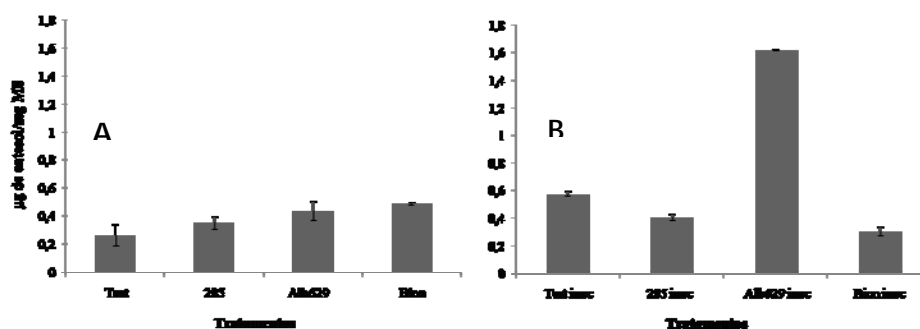


Gráfico 5 Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em plantas de feijoeiro. Em A e B, gráfico dos teores de fenóis solúveis totais. O gráfico à esquerda e da direita representam respectivamente os tratamentos com plantas não inoculadas e inoculadas com *Cff*. Barras representam erro padrão da média

Já para lignina, UFLA285 e ALB629 induziram acúmulo na ausência do patógeno (Gráfico 6A). Na presença de *Cff* apenas o UFLA285 e o ASM induziram este maior acúmulo (Gráfico 6B).

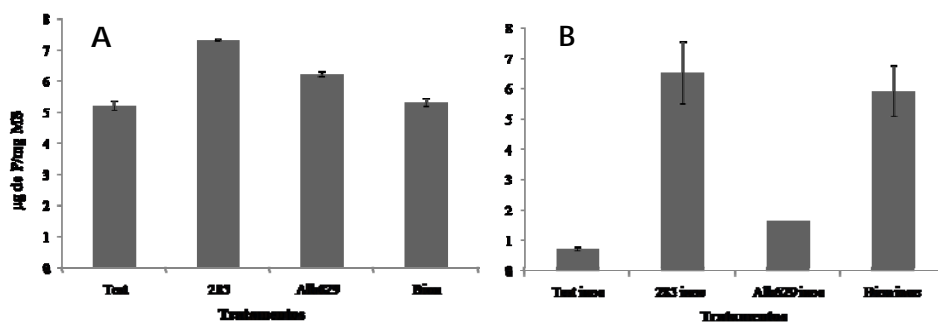


Gráfico 6 Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em plantas de feijoeiro. Em A e B, gráficos de lignina solúveis totais. O gráfico à esquerda e da direita representam respectivamente os tratamentos com plantas não inoculadas e inoculadas com *Cff*. Barras representam erro padrão da média

Com a redução na atividade da PAL, esperava-se uma redução tanto no teor de fenóis totais quanto no de lignina, mas possivelmente, as rizobactérias e o indutor comercial induziram algum efeito compensatório como, por exemplo, a utilização de outras rotas bioquímicas ou que a atividade superior nos dois períodos amostrados é o suficiente para garantir o acúmulo destes produtos finais da rota dos fenilpropanoides.

O estresse oxidativo é uma das respostas à infecção biótica e já foi assinalado em interações compatíveis bactéria-planta (Mendoza, 2011). No entanto, para o patossistema *Cff*-feijão parece que o acúmulo de espécies ativas de oxigênio não é induzido, pois se espera um acúmulo da enzima peroxidase de limpeza em pelo menos um dos pontos amostrados para garantir a homeostase.

Souza e Maringoni (2008) observaram através de microscopia eletrônica de transmissão a presença da *Cff* ao 28º dia após a inoculação. Em genótipos susceptíveis *Cff* colonizou não somente os vasos do xilema, mas também células parenquimáticas e do metaxilema, induzindo o sintoma de murcha. Portanto, um mecanismo que pode também estar sendo induzido em feijão tratado com as rizobactérias é a tolerância a estresse abiótico (Medeiros et al., 2011). Experimentos futuros irão verificar o envolvimento de respostas de tolerância ao estresse hídrico e/ou este como mecanismo auxiliar no controle da murcha-de-curtobacterium.

Além do mais, em nenhum dos pontos amostrados as rizobactérias induziram o acúmulo de POX superior à testemunha tratada, seja para plantas não inoculadas (Gráfico 7A) ou inoculadas (Gráfico 7A). Apenas o indutor comercial induziu o acúmulo de POX e este foi observado apenas no último período amostrado para plantas não inoculadas (Gráfico 7A).

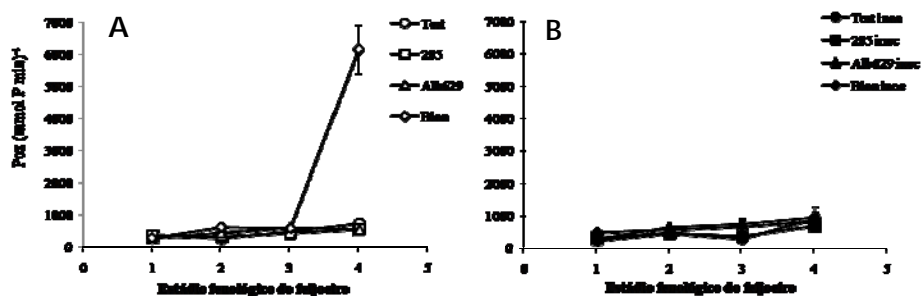


Gráfico 7 Caracterização dos mecanismos bioquímicos envolvidos na resposta de defesa em plantas de feijoeiro. Em A e B, gráficos de peroxidases (POX). Os valores 1, 2, 3 e 4 representam respectivamente os estádios de germinação (folhas cotiledonares expandidas num ângulo de 90°), aparecimento das folhas trifoliolada e folhas trifoliolada totalmente expandidas. Barras representam erro padrão da média

5.5 Estudo da colonização das plantas pelas rizobactérias

Na temperatura de 30 °C, o mutante ALB629^{Rif} foi recuperado 24 DAP das raízes ($10^{5,85}$), caules ($10^{4,48}$) e folhas ($10^{4,01}$) UFC g⁻¹ das plantas inoculadas com *Cff*. Já na temperatura de 20 °C o mesmo foi recuperado apenas na raiz das plantas ($10^{3,22}$) UFC g⁻¹ (Gráfico 8).

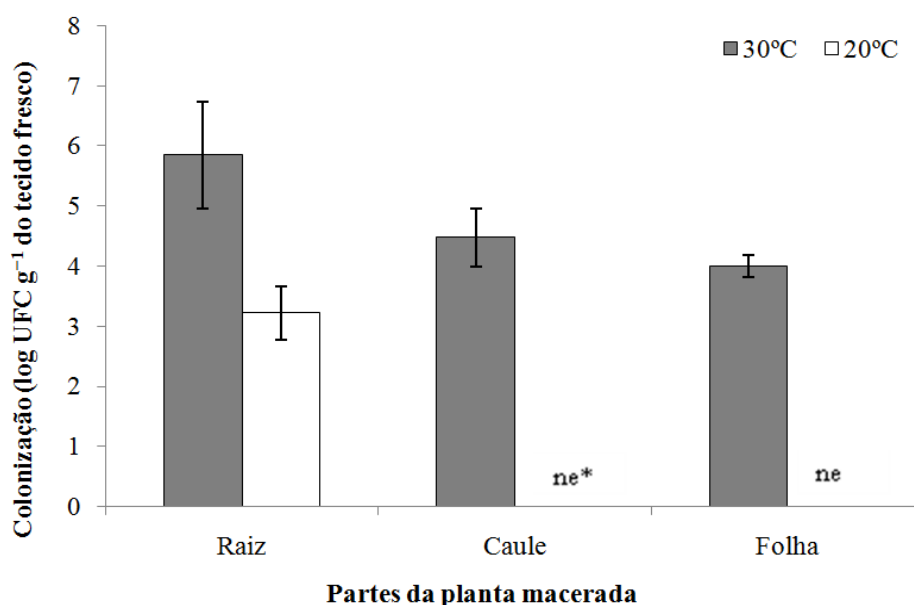


Gráfico 8 Colonização do feijoeiro ao 24 DAP por *Bacillus subtilis* ALB629^{Rif} nas temperaturas de 20 e 30 °C. Média de 2 ensaios para cada temperatura, 4 repetições/ensaio e 6 plantas/repetições. *ne= não encontrado. Barras representam erro padrão da média

Investigação sobre o mutante ALB629^{Rif} revelou que ele colonizou todas as partes da planta analisadas (raiz, caule e folhas) além de manter a capacidade de redução da doença. Além disso, verificou-se que essa colonização foi dependente da temperatura ambiente de cultivo uma vez que na temperatura de 20 °C as rizobactérias foram recuperadas apenas nas raízes e em uma concentração menor ($10^{3,22}$) em relação ao verificado na temperatura de 30 °C ($10^{5,85}$).

Os dados de área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a discriminação da variação entre os tratamentos foi feita pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade, (Gráfico 9).

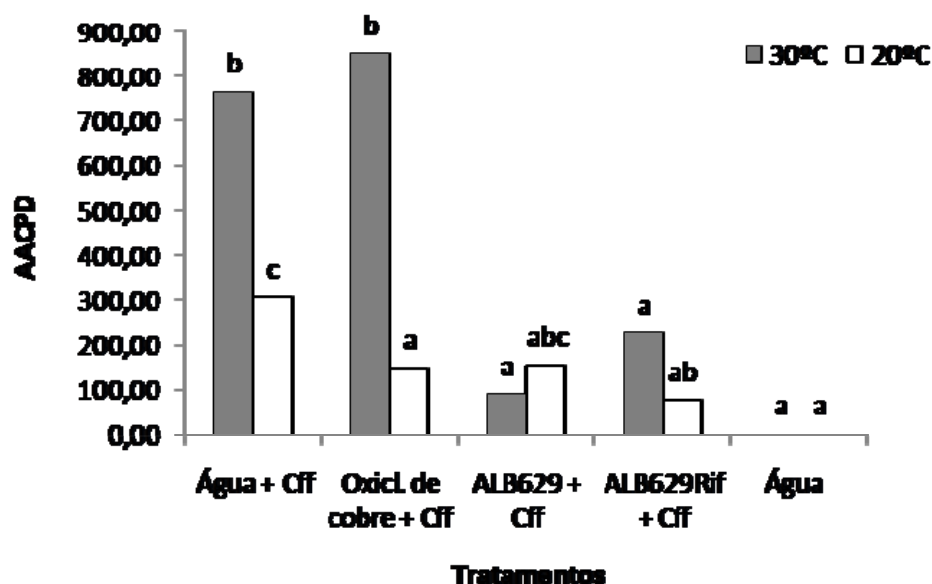


Gráfico 9 Área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) em duas temperaturas diferentes de plantas de feijão obtidas de sementes artificialmente inoculadas com *Cff* e tratadas com o mutante *Bacillus subtilis* ALB629^{Rif}. Média de 2 ensaios para cada temperatura, 4 repetições/ensaio e 6 plantas/repetições

Tanto o isolado selvagem ALB629 de *Bacillus subtilis* quanto o mutante ALB629^{Rif} tiveram crescimento semelhante (Gráfico 10). O maior crescimento do isolado mutante na fase de adaptação se deve provavelmente à ausência do antibiótico ao meio de cultura. Além disso, ambos os isolados (ALB629 e ALB629^{Rif}) controlaram a doença apresentando reduções respectivamente na AACPD em relação à testemunha inoculada de 88 e 71% na temperatura de 30 °C, e de 50 e 75% na temperatura de 20 °C.

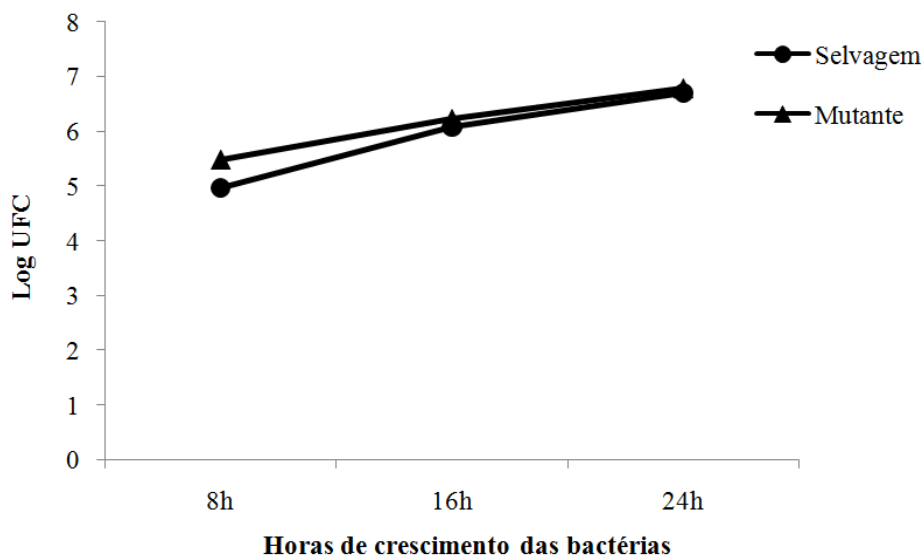


Gráfico 10 Crescimento dos isolados selvagem de ALB629 e mutante ALB629^{rif} em meio ágar nutriente sem o antibiótico nos tempos de 8, 16 e 24 h de crescimento

5.6 Utilização de diferentes fontes de C e N por rizobactérias em diferentes temperaturas

Através da leitura da absorbância em espectrofotômetro de luz no $\lambda = 600$ chegou-se aos seguintes resultados (Gráficos 11A, 11B, 11C e 11D).

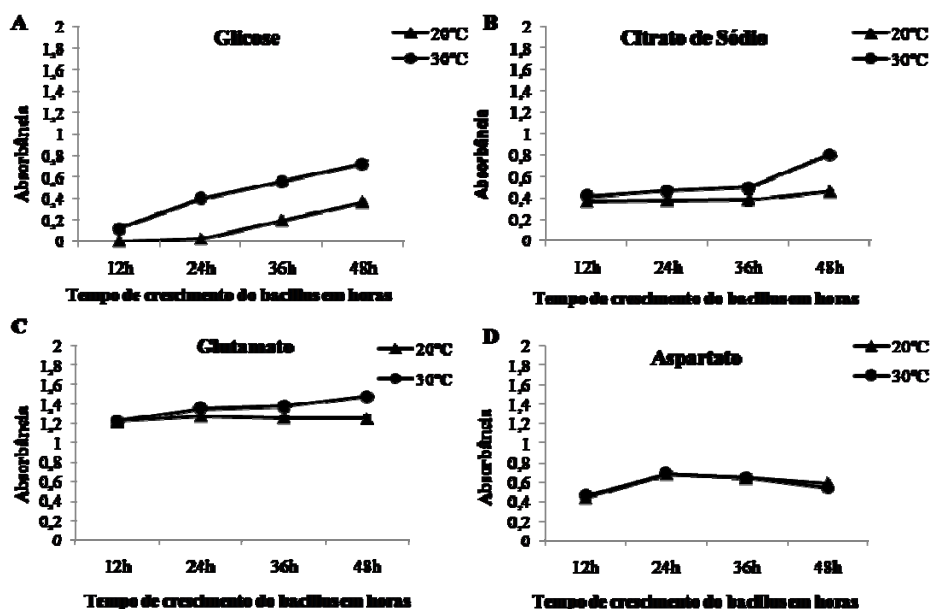


Gráfico 11 Crescimento de ALB629 em meios com diferentes fontes nutricionais nas temperaturas de 20 e 30 °C sob os tempos de 12, 24, 36 e 48 horas. Os gráficos A, B, C e D representam os meios glicose, citrato de sódio, glutamato e aspartato

As raízes de feijoeiro liberam uma grande quantidade de aminoácidos e açúcares livres (Odunfa, 1979) que suprem as demandas de fontes de carbono e nitrogênio dos microrganismos da rizosfera, inclusive patógenos (Youssef & Mankarios, 1968). Quando o isolado ALB629 foi testado para o crescimento em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, verificou-se que o ele cresceu melhor na maior temperatura, exceto no meio contendo o aminoácido aspartato, onde não se verificou diferença de crescimento nas duas temperaturas. Todos os aminoácidos testados suportam a maior produção de surfactina por um isolado de *Bacillus subtilis*, um lipopeptídeo que atua na indução de resistência (Nihorimbere et al., 2009). Ainda precisa ser determinada a produção das moléculas eliciadoras produzidas por ALB629 que induzem resistência, mas o

controle da doença independentemente da temperatura e o crescimento semelhante em aspartato em ambas as temperaturas e seguindo um padrão de crescimento característico de bactérias, com uma provável fase da adaptação até as doze horas, uma fase logarítmica de 12 – 24 h, fase estacionária de 24-36 h e fase de declínio daí em diante, sugere-se que a indução de resistência desempenha um papel importante na defesa de feijoeiro induzida por ALB629 contra *Cff*. Estudos futuros irão determinar a indução de resistência a diferentes temperaturas bem como a produção de surfactina nessas condições.

5.7 Antibiose

Todas as rizobactérias testadas (ALB629, UFLA285, UFLA168*, MEN2) inibiram o crescimento de *Cff* em ambas as temperaturas (20 °C e 30 °C) de forma semelhante. Já nos demais tratamentos (ASM, Água, MCF) a bactéria fitopatogênica cresceu normalmente. O que demonstra que a atividade inibitória direta dos antagonistas também pode ser uma estratégia para a redução da murcha-de-curtobacterium em diferentes temperaturas.

As rizobactérias testadas já haviam demonstrado eficiência para o controle do tombamento e/ou mancha-angular em algodoeiro. A eficiência de controle e indução de resistência em feijão demonstra o amplo espectro de ação desses organismos, o que aumenta as chances de desenvolvimento de um bioproduto para o controle de doenças (Nagorska et al. 2007).

Apesar de ainda não testado em feijoeiro sob condições de campo, os isolados MEN2 e UFLA285 demonstraram em ensaios no campo sucesso na redução do tombamento de pós-emergência em algodoeiro quando usados no tratamento de sementes durante dois anos. Da mesma forma, os mecanismos moleculares envolvidos puderam ser explicados pela regulação de genes

envolvidos tanto na proteção contra estresses bióticos e abióticos (Medeiros, 2009b).

6 CONCLUSÕES

Plantas derivadas de sementes artificialmente inoculadas com *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e tratadas com rizobactérias apresentaram aumento na PSA e TCR além de reduzirem a severidade da murcha-de-curtobacterium.

A presença da população bacteriana nas plantas demonstra que ALB629^{Rif} é um eficiente colonizador de raízes.

A manutenção da defesa de plantas à murcha-de-curtobacterium mediada pela utilização de rizobactérias foi evidenciada nas temperaturas de 20 °C e 30 °C. O isolado ALB629 foi capaz de reduzir a doença e de colonizar o sistema radicular independentemente da temperatura.

As rizobactérias selecionadas não atuaram na promoção de crescimento do feijoeiro, mas induziram ao acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese, fenol e lignina. Essa resposta decresceu na presença do patógeno.

A temperatura influenciou a colonização de plantas pelo isolado de rizobactéria ALB629, mas não na redução da doença e nem na inibição do patógeno *in vitro*.

Conclui-se que o tratamento de sementes com as referidas rizobactérias pode ser um método efetivo e prático para o manejo da murcha-de-curtobacterium do feijoeiro.

REFERÊNCIAS

- ALAM, S.; JOYCE, D.; WEARING, A. Effects of equilibrium relative humidity on in vitro growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v. 36, n. 3, p. 383-388, June 1996.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.
- BIANCHINI, A.; CARNEIRO, S. T. P. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. Doenças do feijoeiro e seu controle. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **Feijão: tecnologia de produção**. Londrina, 2000. p. 55-75.
- BRADBURY, J. F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. London: CAB International Mycological Institute, 1986. 322 p.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Washington, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, Jan./Feb. 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agrofit**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10 jan. 2012.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367 p.
- BURKHOLDER, W. H. The longevity of the pathogens causing the wilt of the common bean. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 35, n. 9, p. 734-740, Sept. 1995.
- CABI/EPPO. **Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens**: distribution maps of plant diseases, map n. 370. Wallingford: CAB International, 1999. Disponível em: <<http://www.cabicompendium.org/cpc/home.asp>>. Acesso em: 23 ago. 2005.
- CHUEIRE, L. M. O. et al. Classificação toxonômica das estirpes de rizóbios recomendados para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento de gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 27, n. 6, p. 833-840, out. 2003.

COLLINS, M. D.; JONES, D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Corynebacterium*, as *Corynebacterium flaccumfaciens*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 129, p. 3545-3548, Nov. 1983.

COMITE DE SANIDADE VEGETAL DEL CONO SUR. **Plagas cuarentenarias: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. Disponível em: <<http://www.cosave.org.py>>. Acesso em: 10 nov. 2011.

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE. **Distribution maps of plant disease**: map n. 85. 5th ed. Farnham Royal, 1992.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 19 mar. 2012.

COOPER, R. M. MAMPs-induced defences and how pathogens overcome it. In: In: REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS, 5., 2010, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2010. 1 CD-ROM.

COSTA, A. S.; PARADELA, O. Evidência adicional sobre a ocorrência de cretamento bacteriano aureolado em feijão no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v. 5, p. 97-99, 1972.

COYNE, D. P.; SCHUSTER, M. L. Bacterial disease of legumes: breeding and resistance. In: SUMMERFIELD, A.; BUNTING, H. (Ed.). **Advances in legume science**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1979. p. 225-233.

DEUNER, C. C. **Inoculação artificial e detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijão**. 2007. 94 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

DOSTER, M. A.; BOSTOCK, R. M. Quantification of lignin formation in almond bark in response to wounding and infection by *Phytophthora* species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, n. 4, p. 473-477, Apr. 1988.

DOWSON, W. J. **Plant disease due to bacteria**. Cambridge: Cambridge University, 1957. 231 p.

FERREIRA, D. F. **Programa SISVAR**. Versão 5.1. Lavras: UFLA, 2006. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>>. Acesso em: 10 out. 2011.

GUIMARÃES, R. J. **Análise do crescimento e da quantificação de nutrientes em mudas de cafeeiro, (*Coffea arabica* L.), durante seus estádios de desenvolvimento em substrato padrão.** 1994. 113 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, 1994.

HEDGES, F. Bacterial wilt of bean (*Bacterial flaccumfaciens* Hedges), including comparisons with *Bacterial phaseoli*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 16, n. 1, p. 1-22, 1926.

HEDGES, F. Bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. **Science**, New York, v. 55, p. 433-434, 1922.

HERBES, D. H. et al. Detecção de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em sementes de feijoeiro produzidas em Santa Catarina. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 53-156, 2008.

HSIEH, T. F. et al. A rapid indoor technique for screening common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for resistance to bacterial wilt [*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins and Jones]. **Revista Mexicana de Fitopatología**, Toluca, v. 21, n. 3, p. 370-374, 2003.

HSIEH, T. F. Resistance of common bean (*Phaseolus vulgaris*) to bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Journal of Phytopathology**, Oxford, v. 153, n. 4, p. 245-249, Apr. 2005.

HSIEH, T. F.; HUANG, H. C.; CONNER, R. L. Bacterial wilt of bean: current status and prospects. **Plant Science**, Shannon, v. 2, n. 1, p. 181-206, 2004.

HUANG, H. C.; ERICKSON, R. S.; HSIEH, T. F. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. **Crop Protection**, Guildford, v. 26, n. 7, p. 1055-1061, July 2007.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

KRAUSE, W. et al. Genetic divergence in snap bean on agronomic traits and resistance to bacterial wilt. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Londrina, v. 9, n. 3, p. 246-252, 2009.

LAMANNA, C. Relation between temperature growth range and size in the genus *Bacillus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 39, n. 5, p. 593-596, 1940.

LAZO, G. R.; GABRIEL, D. W. Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 77, n. 3, p. 448-453, Mar. 1987.

LEITE JÚNIOR, R. P. et al. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Paraná e Santa Catarina. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, p. 303-304, 2001. Suplemento.

MARINGONI, A. C. **Caracterização de isolados de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* e avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium**. 2000. 73 p. Tese (Livre-Docência em Fitopatologia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.

MARINGONI, A. C. Comportamento de cultivares de feijoeiro comum à murcha-de-curtobacterium. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 1, p. 157-162, jan./fev. 2002.

MARINGONI, A. C.; ROSA, E. F. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro no Estado de São Paulo. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 23, n. 2, p. 160-162, 1997.

MCKINNEY, R. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Hellminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, Washington, v. 26, n. 1, p. 195-218, Jan. 1923.

MEDEIROS, F. H. V. **Tratamento biológico de sementes de algodão com *Bacillus spp* com atividade quitinolítica para o controle de patógenos veiculados por semente e patógenos iniciais do algodão**. 2009. 180. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MEDEIROS, F. H. V. et al. *Bacillus spp.* to manage seed-borne *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* damping-off. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 98, p. S102-S104, 2008. Supplement.

MEDEIROS, F. H. V. Management of melon bacterial blotch by plant beneficial bacteria. **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 37, n. 5, p. 453-460, Nov. 2009.

MEDEIROS, F. H. V. Transcriptional profiling in cotton associated with *Bacillus subtilis* (UFLA285) induced biotic-stress tolerance. **Plant and Soil**, The Hague, v. 347, n. 1/2, p. 1-11, Oct. 2011.

MENDOZA, M. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. **Bioteconología Vegetal**, Villa Clara, v. 11, n. 1, p. 67-75, 2011.

MIRANDA FILHO, R. J. **Perda de produtividade em feijoeiro comum cultivar Pérola causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***. 2006. 79 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MORI, T.; SAKURAI, M.; SAKUTA, M. Effects of conditioned médium on activities on PAL, CHS, DAHP synthase (DS-Co and DS-Mn) and anthocyanin production in suspension cultures of *Fragaria ananassa*. **Plant Science**, London, v. 160, n. 2, p. 355-360, Jan. 2001.

NAGORSKA, K.; BIKOWSKI, M.; OBUCHOWSKII, M. Multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 54, n. 3, p. 495-508, Sept. 2007.

NIHORIMBERE, V. et al. Ecological fitness of *Bacillus subtilis* BGS3 regarding production of the surfactin lipopeptide in the rhizosphere. **Environmental Microbiology Reports**, Chicago, v. 1, n. 2, p. 124-130, Apr. 2009.

ODUNFA, V. S. A. Free amino acids in the seed and root exudates in relation to the nitrogen requirements of rhizosphere soil Fusaria. **Plant and Soil**, The Hague, v. 52, n. 4, p. 491-499, 1979.

RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, Guildford, v. 20, n. 1, p. 1-11, Jan. 2001.

RIBEIRO, R. L. D. et al. Characterization of the bacterium inciting bean wildfire in Brazil. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 69, n. 3, p. 208-212, Mar. 1980.

ROBBS, C. F. A bacteriose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Distrito Federal. **Agronomia**, Itaguai, v. 12, p. 231-233, 1954.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 417 p.

SAETTLER, A. W. Disease caused by bactéria. In: HALL, R. (Ed.). **Compendium of bean diseases**. Saint Paul: APS, 1991. p. 23-32.

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

SCHISLER, D. A. et al. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 11, p. 1267-1271, Nov. 2004.

SENA, M. R. et al. Envolvimento de agricultores no processo seletivo de novas linhagens de feijoeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 407-412, mar./abr. 2008.

SHANER, G.; FINNEY, R. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox Wheat. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, 1977.

SOUZA, V. L. et al. Resistência genética em genótipos de feijoeiro a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, n. 4, p. 339-344, 2006.

SOUZA, V. L.; MARINGONI, A. C. Análise ultraestrutural da interação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 34, n. 4, p. 318-320, 2008.

SPANOS, G. A.; WROLSTAD, R. E. Influence of processing and storage on the phenolic composition of Thompson seedless grape juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 38, n. 7, p. 1565-1571, July 1990.

TEGLI, S.; SERENI, A.; SURICO, G. PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. **Letters in Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 4, p. 331-337, Oct. 2002.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C. Transmissibilidade e efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1045-1052, set./out. 2003.

THEODORO, G. F.; MARINGONI, A. C. Murcha-de-curtobacterium do feijoeiro no Estado de Santa Catarina e reação de genótipos a *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 32, n. 1, p. 34-41, 2006.

THOMAS, W. D.; GRANHAM, R. W. Bactéria in apparently healthy pinto beans. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 42, p. 214, 1952.

UESUGI, C. H.; FREITAS, M. A.; MENEZES, J. R. Ocorrência de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em feijoeiro, em Goiás e no Distrito Federal. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 324-327, maio/jun. 2003.

URBANEK, H.; KUZNIAK-GEBAROWSKA, E.; HERKA, H. Elicitation of defence responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, Varsóvia, v. 13, n. 1, p. 43-50, Mar. 1991.

VALENTINI, G. et al. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiologia, detecção e medidas de controle. **Revista Biotemas**, Florianópolis, v. 23, n. 1, p. 1-8, 2010.

VENETTE, J. R.; LAMPRA, R. S.; GROSS, P. L. First report of bean bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* subsp. *flaccumfaciens* in North Dakota. **Plant Disease Note**, Quebec, v. 79, n. 9, p. 966, Sept. 1995.

VIEIRA, C.; PAULA, J. T. J.; BORÉM, A. **Feijão**: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais. Viçosa, MG: UFV, 1998. 596 p.

YOUNG, J. M. et al. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**, Wallingford, v. 75, n. 9, p. 721-763, 1996.

YOUSSEF, Y. A.; MANKARIOS, A. T. Studies on the rhizosphere mycoflora of broad bean and cotton: II., seed and root exudates and their effects on spore germination and growth of the prevalent fungi isolated from the rhizosphere. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 38, n. 3, p. 257-269, 1968.

ZABALA, G. et al. Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of *Glycine max* in response to *Pseudomonas syringae* infection. **BMC Plant Biology**, London, v. 6, n. 11, p. 26-30, Nov. 2006.