

**JOSÉ ROBERTO VIEIRA JÚNIOR**

**PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO DO FEIJOEIRO COMO  
AGENTES DE BIOCONTROLE DE ENFERMIDADES DA PARTE AÉREA  
DA CULTURA.**

**Tese apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Fitopatologia, para  
obtenção de título de “*Doctor  
Scientiae*”.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

V658p  
2005

Vieira Júnior, José Roberto, 1976-

Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. / José Roberto Vieira Júnior. - Viçosa: UFV, 2005.

xiv, 146f : il. ; 29cm.

Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografias.

1. Feijão - Doenças e pragas - Controle biológico.
  2. Feijão - Folhas - Microbiologia. 3. *Bacillus cereus*.
  4. *Pseudomonas putida*. 5. *Phaseolus vulgaris*.
- I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

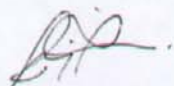
CDD 22.ed. 635.65294

**JOSÉ ROBERTO VIEIRA JÚNIOR**

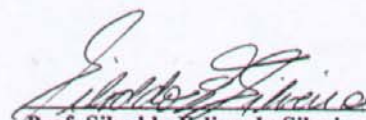
**PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO DO FELJOEIRO COMO  
AGENTES DE BIOCONTROLE DE ENFERMIDADES DA PARTE AÉREA DA  
CULTURA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção de título de "Doctor Scientiae".

**APROVADA: 26 de Abril de 2005**



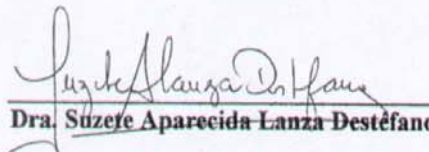
**Prof. José Rogério de Oliveira**  
(Conselheiro)



**Prof. Silvaldo Felipe da Silveira**  
(Conselheiro)



**Dr. Rogério Faria Vieira**



**Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano**



**Prof. Reginaldo da Silva Romeiro**  
(Orientador)

**A Deus, pela saúde, paz, força e gana de vencer, para atingir minhas metas sempre,**

**Aos meus pais José Roberto e Denise (*in memoriam*) e minha mãe-avó Eny, meus maiores incentivadores, pelo amor e dedicação plenos,**

**Aos meus irmãos Romero e Lucas por estarem sempre presentes, sempre me apoiando,**

**À minha noiva Ana Beatriz pelo companheirismo, dedicação e incentivo ao longo da jornada,**

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

**À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização do curso.**

**Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida durante o curso.**

**Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro, que durante esses quatro anos foi mais que orientador, foi amigo e pai. Também, pela orientação, compreensão, paciência e incentivo.**

**Aos Professores José Rogério de Oliveira e Silvaldo Felipe da Silveira, pelos conselhos e incentivos durante o desenvolvimento deste trabalho, onde sempre encontrei as portas abertas para obter ajuda.**

**Ao Dr. Rogério Vieira Faria, pela solicitude com que sempre me tratou e pelas valiosas contribuições ao longo do desenvolvimento deste trabalho.**

**Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos preciosos ensinamentos passados ao longo deste curso.**

**Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pelas prestimosas ajudas.**

**Ao João, funcionário do Sítio Criciúma, pelo apoio nos experimentos de campo.**

**Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico de Doenças de Plantas, em especial à Dora, Flávio e Henrique, sem os quais o trabalho teria sido muitíssimo mais árduo.**

**Aos colegas do Departamento de Fitopatologia, em especial Dartanhã, Diógenes, Dagoberto, Maria Raquel, Olinto e Sérgio Nobre, pela amizade e excelente convivência ao longo desses quatro anos.**

**Ao amigo Márcio Suzuki e a toda Família Liberato, que me acolheram em Viçosa e sempre me apoiaram.**

**Ao meu pai José Roberto Vieira, minha Avó Eny e meus irmãos Romero e Lucas, minha família fiel, que me apoiou sempre, sem permitir jamais que eu fraquejasse na busca dos meus ideais.**

**Ao povo brasileiro, que custeou a maior parte dos meus estudos e, em especial, aos cidadãos de Viçosa, que me receberam com a tradicional hospitalidade mineira.**

**A Deus, sem o qual nada disso teria sido possível.**

## **BIOGRAFIA**

**JOSÉ ROBERTO VIEIRA JÚNIOR, filho de José Roberto Vieira e Denise Maria Pereira da Silva Vieira, nasceu na cidade de Niterói, Estado do Rio de Janeiro, em 03 de janeiro de 1976.**

**Em 1996, ingressou na Universidade Estadual do Norte Fluminense, em Campos dos Goytacazes – RJ, graduando-se em Engenharia Agrônômica, em Janeiro de 2001.**

**Em Abril deste mesmo ano, ingressou no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG.**

**Em Agosto de 2002, transferiu-se, por seu aproveitamento acadêmico, para o nível de Doutorado, no mesmo Programa.**

## ÍNDICE

RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	xii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4
ARTIGO 1.....	8
ISOLAMENTO E SELEÇÃO MASSAL <i>IN VIVO</i> DE PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO DE FEJJOEIRO PARA O BIOCONTROLE DE DOENÇAS DA PARTE AÉREA DA CULTURA .....	8
RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
INTRODUÇÃO .....	9
MATERIAL E MÉTODOS .....	11
RESULTADOS .....	13
DISCUSSÃO .....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
ARTIGO 2.....	26
ANTIBIOSE <i>IN VITRO</i> : UM MÉTODO ACESSÓRIO À SELEÇÃO MASSAL <i>IN VIVO DE</i> AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES DO FEJJOEIRO .....	26
RESUMO.....	26
ABSTRACT .....	26
INTRODUÇÃO .....	27
MATERIAL E MÉTODOS .....	29
RESULTADOS .....	33
DISCUSSÃO .....	35

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ARTIGO 3.....</b>	<b>48</b>
<b>PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO DE FEJJOEIRO E SUA EFICIENCIA NO CONTROLE CONTRA PATÓGENOS DA CULTURA EM CAMPO.....</b>	<b>48</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>48</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>48</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>53</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>ARTIGO 4.....</b>	<b>68</b>
<b>PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE FEJJOEIRO POR UM ISOLADO PROCARIOTA RESIDENTE DE FILOPLANO.....</b>	<b>68</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>68</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>69</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>71</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ARTIGO 5.....</b>	<b>86</b>
<b>COMPATIBILIDADE DE ISOLADOS DE PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO COM ANTIBIÓTICOS E PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO FEJJOEIRO.....</b>	<b>86</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>86</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>87</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>91</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>

<b>ARTIGO 6.....</b>	<b>99</b>
<b>BIOCONTROLE DE DOENÇAS DO FEJJOEIRO COM PROCARIOTAS RESIDENTES DO FILOPLANO EM FUNÇÃO DA CULTIVAR, DA IDADE DAS PLANTAS E DO TIPO DE PATÓGENO.....</b>	<b>99</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>99</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>100</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>101</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>102</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>106</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>107</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>109</b>
<b>ARTIGO 7.....</b>	<b>117</b>
<b>SISTEMICIDADE DE RESPOSTA A DOENÇAS COMO INDÍCIO DA ELEVAÇÃO DE PLANTAS DE FEJJOEIRO AO ESTADO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA .....</b>	<b>117</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>117</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>118</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>119</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>121</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>123</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>124</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>127</b>
<b>ARTIGO 8.....</b>	<b>133</b>
<b>RESTRICTED MULTIPLICATION OF A BACTERIAL PATHOGEN IN BEAN LEAVES PREVIOUSLY EXPOSED TO <i>Bacillus cereus</i>, AN AUTOCHTHONOUS, PHYLLOPLANE-RESIDENT BIOCONTROL AGENT*.....</b>	<b>133</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>134</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>134</b>
<b>MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>136</b>
<b>RESULTS .....</b>	<b>138</b>
<b>DISCUSSION AND CONCLUSIONS.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>141</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>145</b>

## RESUMO

VIEIRA JÚNIOR, José Roberto. D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2005. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Conselheiros: José Rogério de Oliveira e Silvaldo Felipe da Silveira.

O Brasil é o principal produtor de feijão no mundo, com mais de três milhões de toneladas produzidas anualmente. Entretanto, esta produtividade poderia ser maior. Diversos fatores têm impedido que a produção do país aumente, entre eles, a ocorrência de doenças durante o ciclo da cultura tem papel central. Mais de duzentos patógenos já foram relatados ocorrendo em feijoeiro, embora apenas uma dúzia tenha sido relatada como importante. No Brasil, o crestamento bacteriano, a mancha angular, a ferrugem e a antracnose são as principais doenças da parte aérea da cultura, podendo reduzir a produção em até 70%. Atualmente, as medidas de controle adotadas têm sido relativamente eficientes devido à alta variabilidade dos patógenos no campo e pequeno número de genes de resistência disponíveis e o plantio das mesmas cultivares por ciclos sucessivos. Assim o controle biológico tem papel fundamental, quando inserido numa estratégia de manejo integrado de doenças. Dentre os organismos estudados para atuarem no biocontrole de doenças, as bactérias têm sido relatadas como capazes de inibir outros microrganismos por meio de mecanismos de antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência. O presente trabalho teve como objetivos selecionar bactérias do filoplano de feijoeiro como agentes de biocontrole de doenças da parte aérea da cultura, baseado em estratégias de seleção conjuntas *in vitro* e *in vivo*, determinar que mecanismos de controle poderiam estar envolvidos, se os isolados obtidos estariam atuando como promotores de crescimento ou indutores de resistência e testar a efetividade dos isolados em campo, em diferentes cultivares e em idades diferentes da cultura, contra os patógenos desafiantes, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Erysiphe polygoni*, *Phaeoisariopsis griseola*, *Pseudomonas viridiflava*, *Uromyces appendiculatus* e

*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Dos 500 isolados obtidos, três foram mais promissores, quanto ao controle das doenças em casa de vegetação, reduzindo a severidade das doenças quando comparados ao tratamento com água, sendo dois identificados por sequenciamento do RNA16S como *Bacillus cereus* (UFV-75 e UFV-172) e o terceiro, por análise de ácidos graxos, como *Pseudomonas putida* (UFV-108). Nos ensaios de antibiose *in vitro*, verificou-se que a bactéria *Bacillus cereus* (UFV-75) foi capaz de inibir, seja a germinação de conídios ou o crescimento micelial de fungos ou o crescimento de bactérias, todos os patógenos testados. Demonstrou-se em ensaio *in vitro* que *B. cereus* (UFV-75) foi produtor de sideróforos, compostos voláteis, bacteriocinas e da enzima quitinase. As bactérias *B. cereus* (UFV-172) e *P. putida* (UFV-108) também produziram sideróforos, embora o isolado UFV-172 não tenha inibido o crescimento de nenhum dos patógenos *in vitro*. Nos ensaios de campo, UFV-75, UFV-108 e UFV-172, reduziram a severidade da mancha angular (*P. griseola*) e da ferrugem (*U. appendiculatus*). Nos ensaios de promoção de crescimento, o isolado UFV-74 (*Pseudomonas putida*) foi selecionado, por promover o aumento do tamanho das folhas e das plantas em casa de vegetação e também aumentar a produtividade no campo, quando pulverizado sobre as folhas ou via microbiolização de sementes. Nos testes com produtos comerciais, *B. cereus* (os dois isolados) e *P. putida* foram sensíveis apenas aos fungicidas Cupravit Azul Br e Manzat 800. Nos ensaios de amplitude de controle, onde se avaliou a eficiência de *B. cereus* (UFV-172 e UFV-75) e *P. putida*, em controlar: a) o crestamento bacteriano em plantas da cultivar Pérola com idades diferentes; b) a antracnose, o oídio, a mancha bacteriana e a mancha angular na cultivar Pérola e; c) em nove cultivares diferentes contra o crestamento bacteriano, todos os três isolados foram eficientes em controlar o crestamento bacteriano comum em plantas com idades até 60 dias após a emergência. Todos os isolados foram capazes de reduzir a severidade da antracnose, do oídio, da mancha bacteriana e da mancha angular, exceto nos ensaios de UFV-75 X oídio e todos os isolados foram eficientes em controlar o crestamento bacteriano, em todas as cultivares testadas, exceto nos ensaios de UFV-75 X ‘Vermelhinho’. Nos ensaios de sistemicidade, onde buscava-se determinar se *B. cereus* (UFV-172) poderia estar atuando como indutor de resistência sistêmica, o isolado inibiu os patógenos desafiadores *X. a.* pv. *phaseoli* e *M. incognita*, quando aplicado em região separada espacialmente da região que foram aplicados os patógenos, dando indícios

de que o isolado pode estar agindo nas plantas de feijoeiro como indutor de resistência. Esse resultado é corroborado pelo ensaio de restrição de multiplicação de *X. a. pv. phaseoli*, quando o isolado foi aplicado quatro dias antes do patógeno e esse, quando infiltrado em folhas de feijoeiro, teve um desenvolvimento inferior ao de plantas não expostas ao isolado, sugerindo que mecanismos de sinalização que induzem a síntese de compostos que restringem o desenvolvimento dos patógenos são desencadeados nas plantas quando estas são expostas ao isolado e que esse sinal é sistêmico sendo translocado das folhas até as raízes.

## ABSTRACT

VIEIRA JÚNIOR, José Roberto. D.S., Universidade Federal de Viçosa, April de 2005. **Bean phylloplane resident prokaryotes as biocontrol agents of aerial diseases.** Advisor: Reginaldo da Silva Romeiro. Committee Members: José Rogério de Oliveira and Silvaldo Felipe da Silveira.

Brazil is the most important bean producer in the world, producing around 3 million tons of grains per year. Nevertheless, the Brazilian productivity could be higher but several factors have been impeding increases in productivity such as the occurrence of multiple diseases during the plant life cycle. In this sense, more than two hundred pathogens are known to induce diseases in bean but only a few actually are important. Under Brazilian conditions, the bacterial blight, the angular leaf spot, the rust and the anthracnose are the most important bean phylloplane diseases and may account for losses up to 70% if environmental conditions favor disease occurrence. Nowadays, the majority of disease control procedures lack efficiency due to inefficiency of available recommended chemicals in the field, the high level of variability in pathogen populations as well as the few resistance genes detected and manipulated. Therefore, biological control assumes paramount importance when included in global procedures of disease integrated management. Among focused microorganisms as potential biocontrol agents, bacteria have been exhaustively investigated and it is well known that they can act either by direct antibiosis or by inducing systemic resistance. This work had as main objective the selection of prokaryotic phylloplane residents that might act as agents of biological control for bean aerial part diseases, from a universe of 500 isolates obtained from healthy bean phylloplane. In this sense, the strategy of combining “in vitro” as “in vivo” procedures for the massal screen, the investigation on the nature of control mechanisms involved, specific tests to determine whether the observed biocontrol could be attributed to direct antibiosis or to induced resistance, specific assays to

verify whether selected antagonists might act as growth promoters, field tests to investigate whether selected isolates would act as biocontrol agents when delivered to distinct bean cultivars, to plants in different phenology stages and against multiple pathogens (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas viridiflava*, *Uromyces appendiculatus*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola* and *Erysiphe polygoni*) were studied. Out of the set of 500 isolates, three of them - UFV-75, UFV-172 (*Bacillus cereus*) and UFV-108 (*Pseudomonas putida*) - presented the best performance as biocontrol agents being able to reduce diseases severity up to 75% in greenhouse tests. In “in vitro” tests, isolate UFV-75 was able to inhibit growth of all pathogens as well as produce siderophores, volatile antimicrobial compounds, bacteriocins and chitinases. Isolates UFV-172 and UFV-108 also produced siderophores but the latter shown no “in vitro” activity against pathogens. In field trials, all three isolates showed efficiency for reducing severity of rust (*U. appendiculatus*) and angular leaf spot (*P. griseola*). In growth-promoting assays, an isolate distinct from the ones selected as biocontrol agents, namely UFV-74 (*Pseudomonas putida*), behaved as a good promoter, as detected by plant growth parameters evaluation like number of leaves, plant height and seed production, if delivered either by seed microbiolization or by spraying of propagules in the aerial part. Investigating the possibility of mixing the selected biocontrol agents and commercial products recommended in Brazil (registered pesticides, like fungicides, insecticides and herbicides) for the bean culture, it was found that all of them were sensitive only to the fungicides Cupravit Azul Br and Manzat 800. Using *X. a. pv. phaseoli* as challenging pathogen, it was found that all of them were able to low down disease severity but in the interaction isolate UFV-75 and “Vermelhinho” cultivar. All three selected isolates were able to promote the experimental biocontrol of bacterial blight under controlled conditions regardless plant age, up to 70 days after sowing. Using “Perola” as model cultivar, it was verified that protection brought about by the three isolates had character of multiplicity in the sense that this protection was effective against a broad range of pathogens like *C. lindemuthianum*, *P. griseola*, *P. viridiflava* and *Erysiphe polygoni*. In protection sistemicity assays, the isolate UFV-172 provided protection against *X. a. pv. phaseoli* and *Meloidogyne incognita* even if delivered to locals remote from the site of inoculation. This constitutive sistemicity of protection indicates that isolate UFV-172 may promote

biocontrol by inducing systemic resistance and the efficiency by which the antagonist restricted multiplication of a model pathogen (*X. a. pv. phaseoli*) in bean leaf tissue provided an additional evidence for that.

## INTRODUÇÃO GERAL

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é um dos alimentos básicos do brasileiro e de outros povos da América Latina. Encontra-se distribuído entre as diversas classes do nosso povo. Constitui-se não somente como a base energética da alimentação da maior parte da população, como muitas vezes representa a maior fonte de proteínas e de ferro. A maioria das variedades de feijão apresenta em torno de 25% de proteínas (Yokoyama *et al.*, 1997; Borém & Carneiro, 1998).

Se considerarmos a importância econômica do cultivo do feijoeiro no país, esse só perde para as culturas de soja, milho e algodão, que apresentam área plantada e produção mais elevadas. O Brasil, segundo dados da Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAOSTAT) de 2004, foram produzidas, cerca de três milhões de toneladas de feijão, numa área plantada superior a quatro milhões de hectares. Esta produção torna o Brasil o maior produtor de feijão do mundo, ocupando a Índia e a China, o segundo e terceiro lugares (FAOSTAT, 2005), embora esses dois últimos não produzam outras espécies de feijão, como feijão de corda e cowpea. O brasileiro também é grande consumidor dessa leguminosa, com médias de consumo *per capita* superiores a 20 kg/ano (Borém & Carneiro, 1998).

Diversos são os fatores que levaram a expansão da agricultura no país, não só no cultivo do feijoeiro, mas de diversas culturas, como a abertura de novas fronteiras agrícolas, o desenvolvimento de cultivares melhoradas e o surgimento de novas tecnologias, como o plantio direto, o desenvolvimento de sistemas de irrigação e o uso intensivo de defensivos químicos (Santos & Braga, 1997; Campanhola & Bettiol, 2003). Esse último fator sobressai, quando se analisa os números sobre o comércio de agrotóxicos no Brasil, entre os anos de 1960 e 2000 (ANDEF, 2000). O Brasil ocupa o nono lugar no ranking entre os 15 países que mais consomem agrotóxicos no mundo (FAOSTAT, 2005). Na década de 90, o Brasil consumiu 130.000 toneladas de defensivos agrícolas, entre herbicidas, fungicidas e inseticidas, com valores comercializados na ordem de 2,5 bilhões de dólares (Campanhola & Bettiol, 2003). Dentre as 15 culturas que mais consumiram agrotóxicos no país, o feijão ocupa o 10º lugar,

com 2.800 t apenas no ano de 2000, sendo que destas, 821 t correspondem ao consumo de fungicidas (Campanhola & Bettiol, 2003).

Entretanto, esta situação vem sofrendo mudanças drásticas. Uma nova tendência mundial vem se formando, fruto do aumento da disponibilização de informações sobre impacto do uso de produtos químicos na agricultura, no ambiente e na saúde humana. Como consequência, novos segmentos de mercado surgem a cada dia, com interesse em produtos livres desses produtos ou que apresentem comprovações de uso adequado dos mesmos, visando atender as exigências do mercado consumidor (Bettiol & Ghini, 2003).

Seguindo essa tendência os produtores, pesquisadores e extensionistas têm buscado alternativas viáveis ao uso de produtos químicos. Nas últimas décadas, o controle biológico de doenças de plantas, ao lado de outras medidas de controle, como o uso de variedades resistentes, uso de sementes saudáveis, etc., incorporados ao manejo integrado de pragas e doenças, vem aos poucos ganhando espaço (Buchenauer, 1998; Romeiro, 2000; Zambolim, 2001; Mader *et al.*, 2002; Bettiol & Ghini, 2003).

Mais de duzentas doenças foram relatadas ocorrendo durante o ciclo da cultura ao redor do mundo. Entretanto, apenas uma dúzia dessas têm sido causadoras de perdas econômicas (Hall, 1994). Entre elas, a mancha angular, o crestamento bacteriano, antracnose e a ferrugem são as doenças foliares mais destrutivas no Brasil. As perdas provocadas por esses patógenos podem variar de 50% a 70% em condições favoráveis (Sartorato & Rava, 1994; do Vale & Zambolim, 1997).

Atualmente as medidas de controle mais utilizadas para combater as doenças do feijoeiro tem sido o uso de variedades resistentes e o controle químico, que têm eficiência variável, devido à alta variabilidade genética dos organismos, o uso contínuo e não-rotacionado dos mesmos produtos químicos e a baixa quantidade de genes de resistência disponíveis, que tem levado à redução da produtividade do feijoeiro, principalmente em regiões onde os níveis de tecnologia utilizados na agricultura são baixos (Sartorato & Rava, 1994; Vale & Zambolim, 1997).

No controle biológico de doenças, diversos microrganismos, como fungos (El-Katatny *et al.*, 2000), bactérias (Mizubuti *et al.*, 1995; Romeiro *et*

*al.*, 2000; Halfeld-Vieira *et al.*, 2004) e leveduras (Elad *et al.*, 1994) têm sido estudados para o controle de patógenos, nas mais diferentes culturas. Dentre eles, as bactérias exercem papel central, principalmente se pensarmos em controle de doenças no filoplano, pois nesse ambiente, as bactérias compõem o grupo mais numeroso e diverso (Kinkle, 1997; Beattie & Lindow 1999; Lindow & Leveau, 2002). Bactérias têm enorme potencial para atuarem no controle biológico de doenças, haja vista que possuem uma ampla gama de estratégias para sobreviverem em condições adversas de ambiente e em competição direta com outros microrganismos. Dentre esses citamos: antibiose direta, predação, parasitismo, competição por nichos e nutrientes e indução de resistência (Bettiol, 1991; Baker *et al.* 1983; Mizubuti *et al.*, 1995; Halfeld-Vieira, 2002; Romeiro *et al.*, 2000; Silva, 2002; Yuen *et al.*, 2001).

Além disso, as bactérias do filoplano apresentam enorme potencial como promotores de crescimento de plantas, tal qual as rizobactérias ou (PGPR's- Plant Growth Promotion Rhizobacteria) na rizosfera (Kloepper & Schroth, 1981; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Silva, 2002). Ademais, tem sido demonstrado que algumas das espécies capazes de colonizar a superfície de raízes, também são relatadas ocorrendo comumente na superfície de folhas (Hirano & Upper, 2000; Lindow & Leveau, 2002).

Na medida em que se busca selecionar microrganismos para controle biológico de doenças, situação que normalmente se dá em condições controladas em casa de vegetação, torna-se necessário testar estes microrganismos selecionados, em condições de campo, haja visto que as condições ambientais na primeira e segunda situações são totalmente diversas. No campo, o microrganismo pré-selecionado passará por condições de estresse, pela ação dos ventos, da chuva, das variações bruscas de umidade relativa e concentração de nutrientes disponíveis e pela competição de nichos e nutrientes com outros microrganismos epifíticos e patogênicos.

O presente trabalho, que foi dividido em oito artigos, teve como objetivos: i) selecionar os melhores isolados de bactérias do filoplano de feijoeiro, a partir de seleção *in vivo* em casa de vegetação (artigo 1), para o controle dos patógenos desafiantes *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. (Zaumeyer & Thomas, 1957), *Erysiphe polygoni* D.C.,

*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris, *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder 1930) Dowson 1939, *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1987) Vauterin, Hoste Kersters & Swings 1995 e *Uromyces appendiculatus* (Pers) Unger; ii) selecionar *in vitro* os melhores isolados contra os mesmos patógenos desafiantes e caracterizar os mecanismos envolvidos no biocontrole (artigo 2); iii) testar a efetividade de controle dos isolados selecionados contra doenças da cultura do feijoeiro em condições de campo (artigo 3); iv) determinar se os microrganismos selecionados poderiam estar atuando, concomitantemente ao biocontrole, como promotores do crescimento vegetal (artigo 4); v) estudar a compatibilidade dos isolados selecionados com produtos químicos comerciais registrados para a cultura do feijoeiro (artigo 5); vi) determinar a amplitude de controle dos isolados selecionados quanto a idade das folhas testadas, quanto ao número de patógenos controlados e quanto à cultivar utilizada (artigo 6) e; vi) determinar se um dos isolados selecionados pode estar atuando como indutor de resistência sistêmica (artigos 7 e 8).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDEF. Comércio de agrotóxicos no Brasil: 1992-2000. **Gazeta Mercantil**, Caderno de Agribusines, p. B-20, 13 de maio de 2000.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J.R. & MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, n. 4, p. 770-772, 1985.
- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. Bacterial of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.89, n.5, 353-359, 1999.
- BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, Embrapa-CNPDA, p. 223-236, 1991.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.

- BLOEMBERG, G. V. & LUGTENBERG, J. J. Molecular basis of growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Pathology**, v. 1, n. 4, p. 343-350, 2001.
- BORÉM, A. & CARNEIRO, J. E. A cultura In: VIEIRA, C.; PAULA Jr, T. J. & BORÉM, A. (ed.). **Feijão. Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa, Editora UFV, 1998, 596p.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease Protection**, v. 105, n. 4, p.329-348, 1998.
- CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (eds.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.
- ELAD, Y.; KÖHL, J. & FOKKEMA, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. **Phytopathology** v. 84, p.1193, 1994.
- EL-KATATNY, M. H.; SOMITCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M. S. & GUBITZ, G. M. Production of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of phytopatogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Food technology and Biotechnology**. v.38, n.3, p.173-180.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations-Agricultural Database. In: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>, (último acesso em 11 de Abril de 2005). 2005.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Tese (Doutorado), 98p, 2002.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R.S. & MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 6, p.638-643, 2004.
- HALL, R. (Ed.). **Compendium of Bean Diseases**, St. Paul, APS Press, 1991. 73p.
- HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 624-653, 2000.
- KINKLE, L.L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.

- KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: F.B. METTING, Jr. (Ed). **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. Marcel Dekker, New York, 1993. p. 255-274.
- LINDOW, S.E. & LEVEAU, J. H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, n.3, p. 238-243, 2002.
- MADER, P.; FLIEBACK, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P. & NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, n.13, p. 1694-1697, 2002.
- MIZUBUTI, E. S.G; MAFFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J. J.; ROMEIRO, R.S. & BATISTA, U.G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 540-544, 1995.
- ROMEIRO, R. S.; **Bactérias fitopatogênicas**, Viçosa, Imprensa. Universitária, 2000, 283p
- ROMEIRO, R.S.; NEVES, D. M. S. CARVALHO, M. G. & CARRER-FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 220-224, 2000.
- SANTOS, M. L. & BRAGA, M. J. Aspectos Econômicos. In: VIEIRA, C.; PAULA Jr, T. J. & BORÉM, A. (ed.). **Feijão. Aspectos Gerais e Cultura no Estado de Minas Gerais**. Viçosa, Editora UFV, 1998, 596p.
- SARTORATO, A. & RAVA, C. A. **Principais doenças e pragas do feijão comum e o seu controle** (ed.) Goiânia; EMBRAPA-CNPFA, 1994, 290p.
- SILVA, H. S. A. **Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares e como promotoras do crescimento em tomateiro**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Tese de Doutorado. 2002, 108p.
- VALE, F. X. R. & ZAMBOLIM, L. (Ed.), **Controle de Doenças de Plantas : grandes culturas**, Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia, vol. 1, 1997, 554p.
- YOKOYAMA, L. P.; BANNO, K. & KLUTCHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & ZIMMERMANN, M. J.O. (ed.) **Cultura do Feijoeiro no Brasil**, Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1996, 786p.

YUEN, G.Y.; STEADMAN, J.R.; LINDGREN, D.T.; SCHA, D. & JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, n. 20, p. 395-402, 2001.

ZAMBOLIM, L. (ed.). **Manejo Integrado-Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa, Depto. de Fitopatologia, 2001, 722p.

## ARTIGO 1

### ISOLAMENTO E SELEÇÃO MASSAL *IN VIVO* DE PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO DE FEIJOEIRO PARA O BIOCONTROLE DE DOENÇAS DA PARTE AÉREA DA CULTURA

#### RESUMO

Durante o ciclo da cultura, o feijoeiro é acometido por diversas doenças que podem reduzir-lhe a produção em até 70% e cujo controle químico e o uso de variedades resistentes tem tido eficiência variável, devido a alta variabilidade dos patógenos e mal uso dos produtos. Uma alternativa de controle é a aplicação no campo de bactérias do filoplano que possuem uma ampla gama de mecanismos de controle. Neste trabalho objetivou-se selecionar e testar em condições de casa de vegetação 500 procariotas residentes de filoplano contra os patógenos *Phaeoisariopsis griseola* (Pg) e *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* (Xap). Para tanto, folhas de feijoeiros sadios foram coletadas e separadas em três grupos: não-lavadas; lavadas com água e sabão; e desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 min. Estas folhas foram pressionadas sobre meio de cultura padrão de isolamento e as placas incubadas por 24h, a 28°C. Obtiveram-se 500 colônias que foram repicadas e armazenadas. Em ensaios de casa de vegetação, grupos de três plantas foram pulverizadas com suspensão de células bacterianas dos isolados ( $A_{540nm}=0,4$ ) e quatro dias depois, inoculadas com os patógenos desafiantes (Xap;  $A_{540nm}=0,2$ ; Pg =  $5 \times 10^4$  conídios./mL) As plantas foram levadas à câmara de nevoeiro por 24h e, em seguida, mantidas em casa de vegetação, até o surgimento dos primeiros sintomas, que foram quantificados por meio de contagem do número de lesões/cm<sup>2</sup>. Dos quinhentos isolados, UFV-75, UFV-108 e UFV-172 foram selecionados por reduzirem a severidade das doenças em até 75%. A desinfestação de folhas com hipoclorito de sódio a 0,5% provou ser mais eficiente para a obtenção dos residentes de filoplano, pois dois dos três isolados selecionados foram obtidos por esse procedimento.

## ABSTRACT

During culture cycle, the bean plant is susceptible to several diseases that can decrease yield up to 70% and chemical control as well as varietal resistance show low efficiency due to pathogen variability. One of the available alternatives is the use of phylloplane bacteria as biocontrol agents since they use to show a wide range of control mechanisms. In this work five hundred prokaryotic phylloplane residents were selected and tested for the experimental biocontrol of bean diseases by using the challenging pathogens *Phaeoisariopsis griseola*(Pg) and *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*(Xap). For this purpose, healthy bean leaves were harvested and treated as follows: unwashed, washed with soap and tap water and washed with soap and tap water following surface sterilization with 0,5% NaClO per 1 minute. An imprinting of all three types of leaves onto the surface of standard culture medium in Petri dishes and plates were kept for 24h at 28°C. Individualized colonies were transferred to slants and stored. In greenhouse assays, groups of three bean plants were sprayed with a cell suspension of every phylloplane resident ( $A_{540nm}=0,4$ ) and four days after artificially inoculated with the challenging pathogens (Xap;  $A_{540nm}=0,2$ ; Pg =  $5 \times 10^4$  conidia./mL). Next, plants underwent pos-treatment in a moist chamber for 24h and were moved to the environment of a greenhouse. When typical symptoms appeared, disease was quantified, in both cases, by counting lesions. Out the 500 initial isolates, the ones named UFV-75, UFV-108 UFV-172 were selected for having been able to reduce disease severity up to 75%. The method consisting in washing leaves with soap and tap water following surface sterilization with 0,5% NaClO per 1 minute following imprinting onto culture medium surface proved to be the most efficient since 2 out of 3 selected isolates were obtained according to this procedure.

## INTRODUÇÃO

Dentre as razões que levaram à expansão do setor agrícola no Brasil, nas últimas décadas, certamente a expansão de novas fronteiras agrícolas, a

introdução de novas técnicas de cultivo e o uso intensivo de defensivos químicos tem papel determinante (Campanhola & Bettiol, 2003). Este último fator é claramente observado quando se analisa os dados de comércio de agrotóxicos no Brasil, entre os anos de 1960 e 2000. (ANDEF, 2000). O Brasil ocupa o nono lugar no ranking entre os 15 países que mais consomem agrotóxicos no mundo (FAOSTAT, 2005). Na década de 90, o Brasil chegou a consumir 130.000 toneladas de defensivos agrícolas, entre herbicidas, fungicidas e inseticidas, com valores comercializados da ordem de 2,5 bilhões de dólares (Campanhola & Bettiol, 2003). Dentre as 15 culturas que mais consumiram agrotóxicos no país, o feijão ocupa o 10º lugar, com 2.800 t apenas no ano de 2000. Destas, 821 t foram fungicidas (Campanhola & Bettiol, 2003).

Com o processo de intensificação da agricultura, esta se tornou dependente dos insumos agrícolas, como os agrotóxicos, a fim de manter e mesmo aumentar a produtividade das culturas (Campanhola & Bettiol, 2003).

Esta dependência tem levado, em primeira instância, a um desequilíbrio ambiental, por meio de contaminação de lençóis freáticos, rios, solos, etc. O potencial de impacto negativo tem se intensificado a cada dia, com a eliminação de inimigos naturais de pragas e doenças, com o surgimento de populações resistentes de patógenos e com a ressurgência de pragas que já estiveram sobre controle (Campanhola *et al.*, 1998; Zambolim, 2001).

Em segunda instância, o uso desenfreado do controle químico pode estar levando a problemas de saúde pública humana, seja das pessoas agentes que manipulam diretamente os produtos, seja dos consumidores, que ingerem resíduos de produtos químicos presentes em alimentos contaminados (Bettiol, 1991).

Com o aumento da disponibilização da informação sobre o impacto do uso de produtos químicos na agricultura, no ambiente e na saúde humana, tem havido uma mudança no cenário agrícola, com surgimento de segmentos de mercado que se interessam por produtos orgânicos ou certificados que apresentam comprovações do uso adequado dos agroquímicos, por um responsável técnico (Bettiol & Ghini, 2003).

Nas últimas três décadas, o controle biológico de doenças de plantas, ao lado de outras medidas de controle, como o uso de variedades resistentes, uso de

sementes sadias, etc., juntos às técnicas que visam racionalizar o uso de agroquímicos, vêm aos poucos ganhando espaço tanto na pesquisa científica como na extensão rural, como alternativa viável ao controle químico tradicionalmente usado (Nordlund, 1996; Buchenauer, 1998; Romeiro, 2000; Zambolim, 2001; Mader *et al.*, 2002; Bettiol & Ghini, 2003;)

Diversas espécies de microrganismos dentre fungos (El-Katatny *et al.*, 2000), bactérias (Mizubuti *et al.*, 1995; Romeiro *et al.*, 2000; Halfeld-Vieira *et al.*, 2004) leveduras (Elad *et al.*, 1994) tem sido estudadas para o controle de patógenos, nas mais diferentes culturas.

Dentre esses microrganismos, as bactérias têm grande potencial como putativos agentes de biocontrole, pois apresentam diferentes mecanismos que podem atuar no controle, via antagonismo, como a antibiose, parasitismo, competição e indução de resistência (Gerhardson, 2002).

Na cultura do feijoeiro, o controle biológico tem sido usado essencialmente no controle da ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* (Baker *et al.* 1983; Mizubuti *et al.*, 1995; Yuen *et al.*, 2001) e do crestamento bacteriano comum, causada por *Xanthomonas axonopodia* pv. *phaseoli* (Silva *et al.*, 2004; Zanata & Moura, 2004).

Este trabalho teve como objetivo testar *in vivo* 500 isolados de procariotas residentes de filoplano, obtidos de folhas de feijoeiro sadio, cultivar Pérola, contra os patógenos desafiantes *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1987) Vauterin, Hoste Kersters & Swings 1995 e *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris .

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismos, sua origem e seu cultivo.**

Foram coletadas folhas primárias e trifolioladas de plantas de feijoeiro sadio, com idades variando entre 25 e 45 dias após a emergência, da cultivar Pérola, em lavouras localizadas nos municípios de Ervália e Coimbra, MG, bem como no Campo Experimental da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

As amostras foram levadas para o Laboratório de Bacteriologia de Plantas da UFV, foram submetidas à extração de sua microflora epifítica. Para

tanto, dividiu-se-as em três grupos: folhas lavadas com água e sabão, folhas lavadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5%, por 1 min e, em seguida, lavadas em água corrente e folhas não-lavadas. Cada grupo continha aproximadamente 20 folhas e aquelas que passaram por lavagem, l.foram secas ao ar.

Para a obtenção dos isolados, utilizou-se o método de culturas por impressão de folhas ou “imprinting” descrito por Leben (1961), no qual cada folha, tanto a parte adaxial quanto a abaxial, foi pressionada levemente sobre a superfície do meio 523 (Kado & Heskett, 1970) em placas de Petri.

As placas foram mantidas em estufa incubadora tipo B.O.D. por 24h a 28 °C. Após esse período, as colônias que se formaram individualizadas e contrastantes em sua morfologia foram transferidas para tubos de ensaio numerados, com meio 523 (Kado & Heskett, 1970) inclinado. Os isolados foram preservados por liofilização, em óleo mineral esterilizado e em água esterilizada e mantidos em geladeira (Romeiro, 2001)

As culturas dos patógenos do feijoeiro foram obtidas da coleção do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

### **Seleção massal em casa de vegetação**

Para a primeira seleção massal dos melhores antagonistas, foram utilizadas plantas de feijoeiro cultivar Pérola, com 30 dias após a emergência, plantadas individualmente, em copos plásticos de 300 mL. Cada grupo de três plantas foi pulverizado com uma suspensão de cada um das bactérias antagonistas, ajustada em absorbância a 540nm ( $A_{540}$ ) igual a 0,4. Utilizou-se como controle positivo para *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* o fungicida comercial Cupravit Azul BR, à base de oxiclureto de cobre, na dose de 1,33g/L, e como controle negativo, água. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, com irrigação apenas do substrato. Após quatro dias, inoculou-se por aspersão uma suspensão de células do patógeno *X. a.* pv. *phaseoli*, em fase exponencial de cultivo ( $A_{540} = 0,2$ ), sobre as folhas das plantas e estas foram levadas para câmara de nevoeiro, onde permaneceram por 24h. Em seguida, as plantas foram mantidas em casa de vegetação até o aparecimento dos primeiros sintomas, a partir dos quais, determinou-se a severidade das doenças, pela contagem do número de lesões/cm<sup>2</sup>.

O procedimento foi repetido na segunda seleção massal. Desta vez, os isolados foram testados contra o patógeno *Phaeoisariopsis griseola*, cujo inoculo (suspensão de  $5 \times 10^4$  conídios/mL) foi preparada a partir de colônias do fungo cultivadas em meio suco de tomate-ágar (Tuite, 1969). Utilizou-se como testemunha positiva de controle o fungicida Bravonil 750 PM, à base de clorotalonil, preparado na dose de 4g/L, e a água como controle negativo.

Dos 500 isolados testados, foram selecionados os 10 que apresentaram maior redução da severidade de cada uma das doenças.

Em todos os ensaios realizados, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com plantas distribuídas aleatoriamente sobre as bancadas.

### **Determinação dos melhores antagonistas**

Para se escolher os antagonistas mais promissores dentre os pré-selecionados nos ensaios anteriores, repetiram-se os procedimentos dos ensaios de seleção massal, utilizando-se desta vez, 10 repetições para cada isolado e o patógeno contra o qual cada um foi eficiente em reduzir a severidade.

### **Análise de dados**

A análise estatística dos ensaios foi realizada por meio do programa Statistica®, versão 6.0 e utilizou-se, para comparação de médias o teste de Tukey a 5% de significância.

## **RESULTADOS**

### **Seleção massal**

Nos ensaios da primeira seleção massal em que foram testados 500 isolados de procariotas residentes de filoplano, contra *X. a. pv. phaseoli*, 484 isolados não apresentaram nenhum efeito na redução da severidade da doença. Entretanto foi possível selecionar 16 isolados que foram eficientes em reduzir a severidade do crestamento bacteriano comum. Desses 16 isolados, 14 mostraram-se mais eficientes que o tratamento com o fungicida comercial a base de oxicloreto de cobre (Figura 1). O isolado UFV-197, apresentou o melhor desempenho na redução da severidade, entre os 500 testados para controlar o crestamento bacteriano, sendo capaz de reduzir a severidade da

doença em até 90 %, quando comparado este tratamento com o tratamento com pulverização de água apenas.

Nos ensaios com o patógeno desafiante *P. griseola*, dos 500 isolados testados, 16 foram eficientes em reduzir a severidade da mancha angular do feijoeiro e 484 não produziram efeito algum na redução da severidade. Desses 16 isolados, sete foram mais eficientes que o fungicida comercial (Figura 2).

Entre os 500 isolados testados, UFV-74 foi capaz de reduzir a severidade da mancha angular em até 86%, quando comparado com o tratamento com água.

Dos 500 isolados testados, 27 foram capazes de reduzir a severidade de pelo menos uma das doenças. Desses 27, cinco reduziram a severidade de ambas as doenças. Desses 27 melhores isolados que apresentaram algum efeito na redução da severidade de pelo menos um dos patógenos, 11 foram obtidos a partir do método de lavagem das folhas com água e sabão, nove foram de folhas sem tratamento e sete foram provenientes do tratamento das folhas de feijoeiro com hipoclorito de sódio a 0,5 % (Tabela 1).

Os dez melhores isolados selecionados entre os ensaios contra a mancha angular e o crestamento bacterianos foram re-testados contra os mesmos patógenos desafiantes e apresentaram desempenho semelhante ao obtido nos ciclos seleção massal (Figuras 3 e 4). Alguns isolados proporcionaram níveis de controle superiores aos verificados nos ensaios de seleção massal, como nos casos dos isolados UFV-75 e UFV-108 contra *X. a. pv. phaseoli* e de UFV-75 contra *P. griseola*.

Em ambos os ensaios, alguns isolados promoveram o aumento da severidade do crestamento bacteriano e da mancha angular do feijoeiro, quando comparados com o tratamento com água (Figuras 5 e 6).

Foram selecionados os quatro melhores isolados, capazes de reduzir a severidade de ambas as doenças, para testes em campo. São eles: UFV-74, UFV-75, UFV-108 e UFV- 172. O isolado UFV-197, embora tenha conseguido controlar ambas as doenças, foi descartado, pois apresentou problemas de baixa capacidade de sobrevivência em diferentes métodos de preservação e perda da capacidade de cultivo, após repicagens sucessivas. Os isolados UFV-172, UFV-75 e UFV-74 foram identificados com emprego de sequenciamento do RNA16S

(Department of Genetics – Genome Research Unit. Universitat Kaiserslautern, Alemanha) UFV-172 e UFV-75 foram identificados como espécies de *Bacillus cereus* e UFV-74 uma espécie de *Pseudomonas putida*. O isolado UFV-108 foi identificado por análise de ácidos graxos como sendo *Pseudomonas putida*.

## DISCUSSÃO

Nos ensaios de seleção massal e re-testagem dos melhores isolados selecionados foi possível inferir que, embora as bactérias componham o grupo de microrganismos de maior diversidade e quantidade na superfície foliar (Lindow & Leveau, 2002), apenas uma pequena parte desses microrganismos tem papel na supressão de fitopatógenos. Esse fato é corroborado por diversos trabalhos (Korsten *et al.*, 1995; Kong *et al.*, 1997; Romeiro *et al.*, 2000; Halfeld-Vieira, 2002; Halfeld-Vieira *et al.*, 2004) em que os autores demonstram que a maioria dos isolados obtidos de filoplano não apresenta nenhum efeito contra os patógenos desafiadores e, em alguns casos, podem até acentuar a severidade da doença (Fernando *et al.*, 1994; Halfeld-Vieira, 2002;). Esses fatos foram verificados neste trabalho, pois, dos 500 isolados testados contra os patógenos desafiadores, apenas 5,6 % foram eficientes contra pelo menos um dos patógenos; e apenas cinco foram eficazes contra ambos os patógenos (1%). Alguns isolados promoveram o aumento da severidade de *X.a.pv. phaseoli* e *P. griseola*.

Entre os isolados selecionados, dois são espécies de *Bacillus* (UFV-75 e UFV-172) e uma é da espécie *Pseudomonas* (UFV-108). Ambos os gêneros são relatados como agentes de biocontrole eficientes em diversos patossistemas (Pruvost, & Luisetti, 1991; Lang *et al.*, 2002; Halfeld-Vieira *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

Em se tratando dos métodos de extração da microflora epifítica, constatou-se que, embora os métodos menos agressivos de obtenção de isolados (“imprinting” de folhas não-lavadas e de folhas lavadas com água e sabão) tenham propiciado grande número de isolados com algum potencial de controle, o método de extração com hipoclorito de sódio a 0,5% foi o mais útil na seleção de isolados com maior eficiência na redução da severidade das doenças.

Possivelmente, o fato de dois dos isolados serem formadores de endósporos (UFV-75 e UFV-172), pode ser uma vantagem adaptativa dos mesmos para sobrevivência no filoplano (Whipps, 2001; Gerhardson, 2002; Lindow. & Leveau, 2002). Outra razão que pode explicar o porque de serem espécies de *Bacillus* e *Pseudomonas* os melhores isolados selecionados via lavagem com hipoclorito de sódio a 0,5%, está relacionada com o fato de que bactérias destes gêneros são comumente encontradas na superfície de folhas, imersas em estruturas denominadas biofilmes, estruturas estas compostas primariamente por polissacarídeos, capazes de proteger as células bacterianas da ação de compostos tóxicos (como o próprio hipoclorito), resistir a dessecação e a ação de radiação ionizante na filosfera, etc. (Monier & Lindow, 2004).

Há que se ressaltar, também, que, a idéia de se buscar antagonistas diretamente no filoplano de plantas sadias de feijoeiro, em lavouras com diferentes, parece ser estratégia correta, conforme recomendam Chen *et al.*, (1996). Num conceito de microecologia vegetal, a chance de se encontrarem microrganismos com potencial de biocontrole é maior quando estes são obtidos em associações com a própria planta que se deseja proteger. Há maior probabilidade do microrganismo autóctone estar mais bem adaptado às condições impostas pelo microambiente do filoplano, que um organismo introduzido, obtido de outro hospedeiro. Esse fato é corroborado nos ensaios de biocontrole deste trabalho, pois entre a aplicação do candidato a antagonista e o patógeno desafiante, houve um lapso de 96h, tempo suficiente para confirmar a capacidade do isolado em colonizar o filoplano. Segundo Hirano & Upper (2000) e Kinkle (1997), após a aplicação massal de isolados bacterianos, a população deles reduz a menos de 99% de indivíduos viáveis na superfície da folha nas primeiras 24 h. Essa população tende a crescer nas 24 h seguintes e a se estabilizar entre 24 e 48 h após, quando os isolados são capazes de colonizar a superfície da folha. Quando os isolados não são capazes de sobreviver no filoplano, em poucos horas após a aplicação da suspensão de células, a população tende a decrescer até desaparecer completamente.

O efeito de biocontrole dos isolados selecionados contra a mancha angular e o crestamento bacteriano foi bastante significativo, quando comparado com o tratamento químico tradicional. A combinação de isolados com

fungicidas tradicionais pode ser uma estratégia interessante de controle de doenças fúngicas, somando-se os mecanismos de controle do microrganismo com os do fungicida, sem, no entanto, fazer pressão de seleção sobre os patógenos, reduzindo a chance de ocorrerem isolados resistentes dos patógenos (Zambolim, 2001; Campanhola & Bettiol, 2003; Stadinik & Talamini; 2004). Por outro lado, em se tratando de estratégias de controle de bacterioses, não só do feijoeiro, como das mais diferentes culturas, não existem produtos químicos de eficiência comprovada (Maringoni, 1988; Vieira, 1988; Oliveira *et al.*, 1993; Hall, 1994; Sartorato & Rava, 1994; Paula-Júnior & Zambolim, 1998; Romeiro, 2001).

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDEF. Comércio de agrotóxicos no Brasil: 1992-2000. **Gazeta Mercantil**, Caderno de Agribusines, p. B-20, 13 de maio de 2000.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J.R. & MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, n. 4, p. 770-772, 1985.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 79-96, 2003.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease Protection**, v. 105, n. 4, p.329-348, 1998.
- BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**, Jaguariúna, Embrapa-CNPDA, p. 223-236, 1991.
- CAMPANHOLA, C.; RODRIGUES, G. S. & BETTIOL, W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um Programa de Racionalização do Uso de agrotóxicos no Brasil. In: RODRIGUES, G. S. **Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur**, Montevideo, PROCISUR, 1998. p. 43-49.
- CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.
- CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L. & KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese

- agriculture. In: UTKHEDE, R. S. & GUPTA, V. K. (ed.) **Management of soil born diseases**, Ludhiana, Kalyani Publishers Co. 1996, p. 165-184.
- EL-KATATNY, M. H.; SOMITCH, W.; ROBRA, K.H.; EL-KATATNY, M. S. & GUBITZ, G. M. Production of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of phytopatogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. **Food technology and Biotechnology**, v.38, n.3, p.173-180.
- ELAD, Y.; KÖHL, J. & FOKKEMA, N.J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. **Phytopathology**, v. 84, p.1193-1994.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations-Agricultural Database. In: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>, (último acesso em 11 de Abril de 2005). 2005.
- FERNANDO, W. G. D; WATSON, A. K. & PAULITZ T. C. Phylloplane *Pseudomonas* spp. enhance disease caused by *Colletotrichum coccodes* in velvetleaf. **Biological Control**, v. 4, n.1, p. 125-131, 1994.
- GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trend in Biotechnology**, v. 20, n.8, p. 338-343, 2002.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Tese (Doutorado), 98p., 2002.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R.S. & MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 6, p.638-643, 2004.
- HALL, R. (Ed.). **Compendium of Bean Diseases**, St. Paul, APS Press, 1991. 73p
- HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 624-653, 2000.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969 – 979, 1970.

- KINKLE, L.L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.
- KONG, G.A.; KOCHMAN, J.K. & BROWN, J. F. Phylloplane bacteria antagonistic to the sunflower pathogen *Alternaria helianthus*. **Australasian Plant Pathology**, v. 26, n.2, p.85-87, 1997.
- KORSTEN, L.; De JAGER, E. S. & De VILLIERS, E. E. Evaluation of Bacterial Epiphytes isolated from Avocado Leaf and Fruit Surfaces for Biocontrol of Avocado Post-harvest Diseases. **Plant Disease**, v.79, n.10, p.1149-1156, 1995.
- LANG, W.S.; SHIH, I. L.; WNAG, C. H.; TSENG, K. C.; CHANG, W.T.; TWU, Y. K.; RO, J. J. & WANG, C. L. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p. 321-328, 2002.
- LEBEN, C. Microorganisms on cucumber seedlings. **Phytopathology**, v.51, p.553-557, 1961.
- LINDOW, S.E. & LEVEAU, J. H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.3, p. 238-243, 2002.
- MADER, P.; FLIEBACK, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P. & NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, n.5573, p. 1694-1697, 2002.
- MIZUBUTI, E. S.G; MAFFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J. J.; ROMEIRO, R.S. & BATISTA, U.G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 540-544, 1995.
- MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos no controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro e na transmissibilidade de *Xanthomonas campestris*, pv. *phaseoli* na semente. **Fitopatologia Brasileira**, v.13, n.1, p. 97, 1988.
- MONIER, J. M. & LINDOW, S. E. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n.1, p. 346-355, 2004.
- NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and Information**, v. 17, n. 2, p.35-44, 1996.
- OLIVEIRA, S. H. F.; VALARINI, P. J.; RECCO, C.A.V. Controle químico do cretamento bacteriano comum do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.18, suplemento, p.295, 1993 (resumo)

- PAULA-JÚNIOR, T. J. & ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. & BORÉM, A. (ed.). **Feijão Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa, Editora UFV, 1998. p.375-432.
- PRUVOST, O. & LUISETTI, J. Attempts to develop a biological control of bacterial leaf spot of mangoes. **Acta Horticulturae**, v. 291, n.2, p. 324-327 1991.
- ROMEIRO, R. S.; **Bactérias fitopatogênicas**, Viçosa, Imprensa. Universitária, 2000, 283p.
- ROMEIRO, R.S.; NEVES, D. M. S. CARVALHO, M. G. & CARRER-FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 220-224, 2000.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**, Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2001, 297p.
- SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (ed.) **Principais doenças e pragas do feijão comum e o seu controle**, Goiânia; EMBRAPA-CNPFA, 1994, 290p.
- SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C. & FARIAS, D. R. Atividade antimicrobiana in vitro e efeito de doses do isolado bacteriano DFs842, em casa de vegetação, no biocontrole do crestamento bacteriano comum do feijão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, suplemento, p. 144. 2004. (Resumo)
- SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R.S.; CARRER-FILHO, R.; PEREIRA, J. L.A; MIZUBUTI, E. S. G & MOUTNEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus*, against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n.2, p. 371-375, 2004.
- STADNIK, M. J. & TALAMINI, V. (Ed.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**, Florianópolis, CCA/UFSC, 2004, 293p.
- TUITE, J. **Plant Pathological Methods**, Minneapolis, Burgess Publisher Co., 1969, 239p.
- VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**, Viçosa, Imprensa. Universitária, 1988. 231p.
- YUEN, G.Y.; STEADMAN, J.R.; LINDGREN, D.T.; SCHA, D. & JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, n. 20, p. 395-402, 2001.

- WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, special issue, p. 487-511, 2001
- ZAMBOLIM, L. (ed.). **Manejo Integrado-Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**, Viçosa, Depto. de Fitopatologia, 2001.722p.
- ZANATTA, Z. G. C. N.; MOURA, A. B. Avaliação de bactérias biocontroladoras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na cultura do feijão em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, supl., p. 170, 2004. (Resumo)

Tabela 1- Antagonistas selecionados por diferentes métodos de tratamentos das folhas de feijoeiro que proporcionaram controle satisfatório\* para pelo menos um dos patógenos desafiantes, em plantas de feijão cultivar Pérola.

Isolado	Método de tratamento	Doença controlada
UFV-03	Folhas não-tratadas	Mancha Angular
UFV-04	Folhas não-tratadas	Crestamento Bacteriano
UFV-11	Folhas não-tratadas	Mancha Angular
UFV-26	Folhas não-tratadas	Mancha Angular
UFV-40	Lavado com água e sabão	Crestamento Bacteriano
UFV-44	Lavado com água e sabão	Mancha Angular
UFV-47	Lavado com água e sabão	Crestamento Bacteriano
UFV-58	Lavado com água e sabão	Mancha Angular
UFV-63	Lavado com água e sabão	Mancha Angular
UFV-70	Lavado com água e sabão	Mancha Angular
UFV-74	Lavado com NaClO 5%	Mancha Angular e Crestamento Bacteriano
UFV-75	Lavado com NaClO 5%	Mancha Angular e Crestamento Bacteriano
UFV-97	Lavado com NaClO 5%	Mancha Angular
UFV-108	Folhas não-tratadas	Mancha Angular e Crestamento Bacteriano
UFV-116	Folhas não-tratadas	Mancha Angular
UFV-118	Folhas não-tratadas	Crestamento Bacteriano
UFV-121	Folhas não-tratadas	Crestamento Bacteriano
UFV-141	Lavado com água e sabão	Crestamento Bacteriano
UFV-150	Lavado com água e sabão	Crestamento Bacteriano
UFV-163	Lavado com água e sabão	Crestamento Bacteriano
UFV-172	Lavado com NaClO 5%	Mancha Angular e Crestamento Bacteriano
UFV-178	Lavado com NaClO 5%	Crestamento Bacteriano
UFV-191	Lavado com NaClO 5%	Crestamento Bacteriano
UFV-197	Lavado com NaClO 5%	Mancha Angular e Crestamento Bacteriano
UFV-366	Lavado com água e sabão	Mancha Angular
UFV-404	Folhas não-tratadas	Crestamento Bacteriano
UFV-442	Lavado com água e sabão	Mancha Angular

\* Entende-se por satisfatório o controle que foi superior ao tratamento com água.

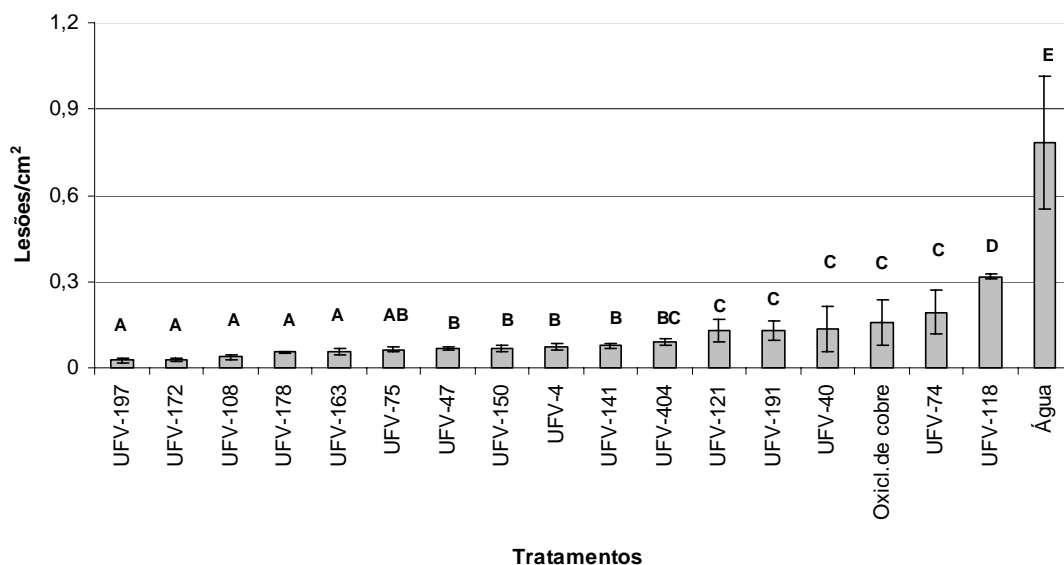


Figura 1-Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro cultivar Pérola causadas pelo crestamento bacteriano comum em folhas previamente atomizadas com os diferentes antagonistas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

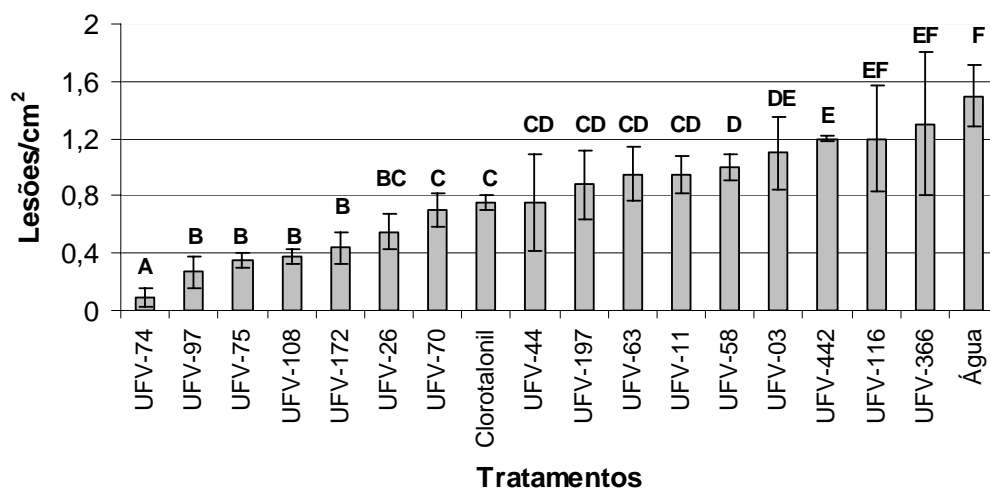


Figura 2-Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro cultivar Pérola causadas pela mancha angular em folhas previamente atomizadas com os diferentes antagonistas. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

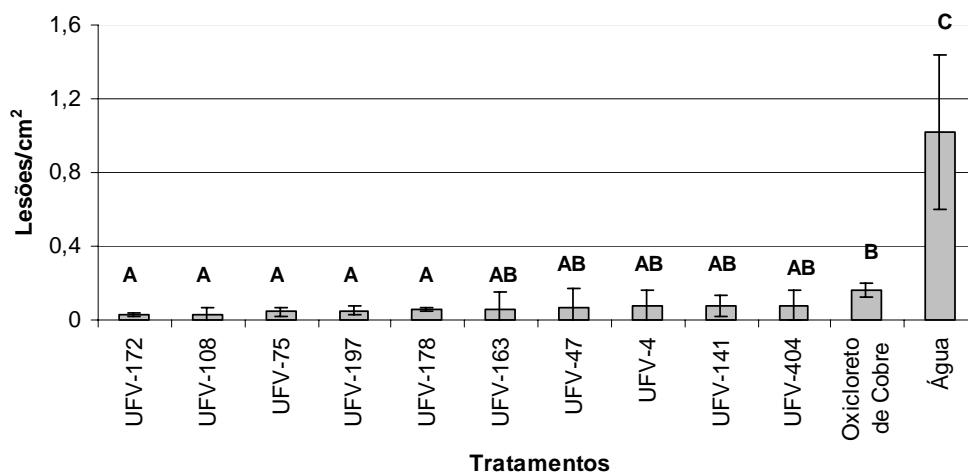


Figura 3-Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro cultivar Pérola causadas pelo crestamento bacteriano comum em folhas previamente atomizadas com os dez melhores antagonistas da primeira seleção massal. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

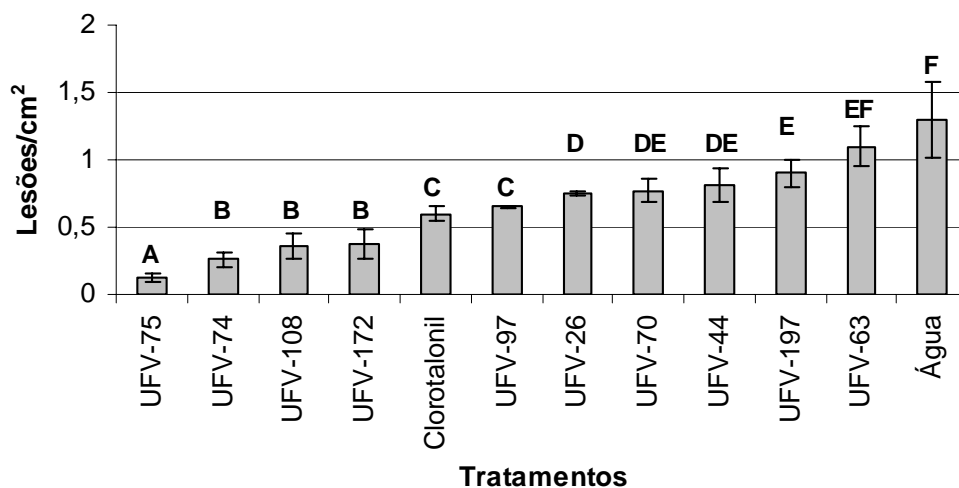


Figura 4-Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro cultivar Pérola causadas pela mancha angular em folhas previamente atomizadas com os dez melhores antagonistas da primeira seleção massal. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

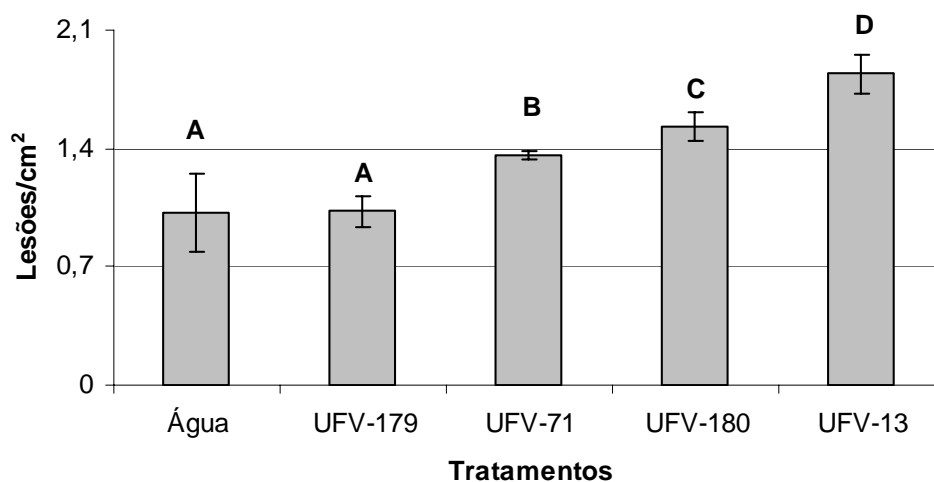


Figura 5-Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro cultivar Pérola causadas pelo crestamento bacteriano comum em folhas previamente atomizadas com os diferentes antagonistas que promoveram o aumento de severidade da doença. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

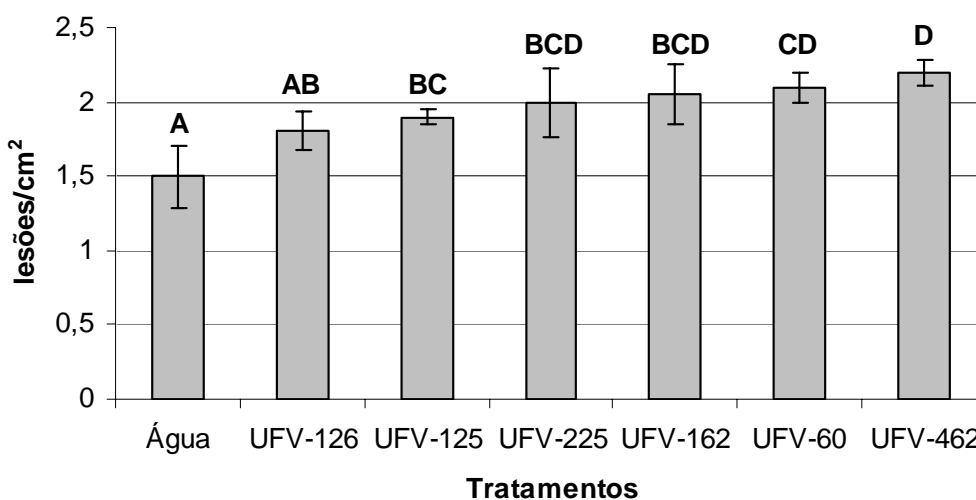


Figura 6-Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro cultivar Pérola causadas pela mancha angular em folhas previamente atomizadas com os diferentes antagonistas que promoveram o aumento de severidade da doença. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão

## ARTIGO 2

### ANTIBIOSE *IN VITRO*: UM MÉTODO ACESSÓRIO À SELEÇÃO MASSAL *IN VIVO* DE AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES DO FEIJOEIRO

#### RESUMO

Entre os mecanismos envolvidos no biocontrole de doenças por bactérias do filoplano, a antibiose parece ser o mecanismo mais importante. Objetivou-se neste trabalho determinar quais formas de antibiose estariam envolvidas no controle de doenças de parte aérea do feijoeiro, por procariotas residentes de filoplano. Obteve-se 500 isolados e com estes, realizaram-se os ensaios de inibição de germinação de esporos de *Uromyces appendiculatus* (Ua), *Phaeoisariopsis griseola* (Pg), *Erysiphe polygoni* (Ep) e *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl), inibição do crescimento bacteriano de *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* (Xap) e *Pseudomonas viridiflava* (Pv) e micelial dos fungos Pg e Cl, em dupla camada. Com os melhores isolados selecionados *in vivo*, UFV-75, UFV-172 (ambos *Bacillus cereus*) e UFV-108 (*Pseudomonas putida*), realizaram-se os testes de produção de: compostos voláteis, sideróforos, HCN, quitinase e  $\beta$ -1,3 glucanase. Dos 500 isolados testados, 272 apresentaram algum efeito inibitório sobre pelo menos um dos patógenos, nos testes de camada dupla e inibição de germinação, e 40 inibiram pelo menos um fungo e uma bactéria. UFV-75 (*Bacillus cereus*) produziu sideróforos, HCN, compostos voláteis e quitinase. Os isolados UFV-108 e UFV-172 produziram sideróforos e o isolado UFV-172 não teve ação direta sobre nenhum dos patógenos. Estes resultados, à exceção dos obtidos para UFV-172, ajudam a explicar por que os isolados UFV-75 e UFV-108 foram capazes de controlar os patógenos testados *in vivo* e *in vitro*. Acredita-se que o UFV-172 possa estar atuando como indutor de resistência em plantas de feijoeiro.

#### ABSTRACT

Among mechanisms involved in the biocontrol of plant diseases by phylloplane residents, antibiosis seems to be the most important and this paper

aimed to investigate which antibiosis mechanisms might take part in the biocontrol. Starting from 500 prokaryotic phylloplane residents previously obtained, inhibition assays were carried out with every isolate, as follows: a) germination of uredinospores of *Uromyces appendiculatus* (*Ua*) and conidia of *Phaeoisariopsis griseola* (*Pg*), *Erysiphe polygoni*(*Ep*) e *Colletotrichum lindemuthianum*(*Cl*) b) inhibition growth of *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* (*Xap*) e *Pseudomonas viridiflava* (*Pv*); inhibition of mycelial growth of *Pg* e *Cl*. Isolates previously selected based on “in vivo” assays (Chapter 1) - namely UFV-75 and UFV-172 (*Bacillus cereus*) and UFV-108 (*Pseudomonas putida*) – were also tested for the ability to produce inhibitory volatile compounds, siderophores, HCN chitinases and  $\beta$ -1,3 glucanases according to procedures described by Catellan (1999). Two hundred seventy two isolates out of 500 showed inhibitory action against at least one of the challenging pathogens in spite of the fact that only 40 out of 500 had been able to inhibit a fungus and a bacterium. Isolate UFV-75 did produced siderophores, HCN, chitinases and inhibitory volatile compounds while isolates UFV-108 and UFV-172 produced siderophores but isolate UFV-172 did not show direct inhibitory activity against any pathogen under investigation. Results suggest that, for isolates UFV-75 and UFV-108, that acted as biocontrol agents in “in vivo” tests, direct antibiosis may take part in the process. On the other hand, for isolate UFV-172, lacking direct antibiosis effect, the observed “in vivo” biocontrol might be credited to induced resistance but additional tests are needed to confirm this hypothesis.

## INTRODUÇÃO

Dentro de um programa de seleção de microrganismos de biocontrole doenças em plantas, existem duas estratégias: a seleção massal *in vivo* e a seleção massal *in vitro*. Em ambos os casos, existem fatores positivos e negativos que limitam a eficiência na seleção de microrganismos (Mariano, 1993). A seleção massal *in vivo* tem como ponto positivo uma maior aproximação das condições reais na planta as quais o isolado a ser testado vai ser exposto. Por outro lado, fatores como: espaço físico, mão-de-obra, cultura

escolhida como alvo e tempo disponíveis limitam o uso dessa estratégia pois torna-se necessário trabalhar com um número menor de isolados (Bettiol, 1991).

Quando se utiliza a seleção massal *in vitro*, é possível testar centenas de microrganismos potencialmente antagonistas, via métodos quantitativos e qualitativos que não demandam muito espaço nem muito tempo (Mariano, 1991). Nos testes *in vitro*, em geral, o tempo máximo necessário para realizar uma seleção de microrganismos para controle biológico de doenças de plantas não é superior a um mês, quando se testas fungos, por exemplo, que tem crescimento micelial lento. Nesse método de seleção, o fenômeno antibiose é o que mais comumente ocorre. Segundo Cook & Baker (1989), antibiose é o fenômeno pelo qual um microrganismo inibe o crescimento de outro pela produção de compostos tóxicos de baixo peso molecular. Este é outro ponto importante dos testes *in vitro*, pois permite entender os mecanismos que estão envolvidos no biocontrole por antibiose, tais como: a produção de sideróforos, compostos quelantes de ferro, produzidos, por espécies de *Pseudomonas* entre outras, que levam à inibição do crescimento do patógeno (Kloepper *et al.*, 1980; Fernando *et al.*, 1996); produção de enzimas líticas, como quitinases, que atuam na parede celular de fungos verdadeiros (Zhang & Yuen, 2000), e celulasas, que atuam em parede celular de *Oomycetes* (Halfeld-Vieira, 2002); produção de metabólicos tóxicos, como a herbicolina O, antibiótico produzido por *Erwinia herbicola* capaz de atuar sobre outras bactérias (Ishimaru *et al.*, 1988); produção de compostos voláteis, como o ácido cianídrico (HCN), que inibem o crescimento micelial e a germinação de esporos de fungos fitopatogênicos (Cattelan, 1999).

Mas, para alguns pesquisadores, o método de seleção de microrganismos *in vitro* para controle de doenças de plantas é falho, pois muitas vezes os resultados obtidos *in vitro* não se reproduzem *in vivo*, seja em casa de vegetação ou em campo (Bettiol, 1991; Andrews 1990; Halfeld-Vieira, 2002).

Outro ponto negativo é que se o mecanismo de controle não for mediado por antibiose, corre-se o risco de descartarem-se bons antagonistas, que podem ser indutores de resistência sistêmica (Halfeld-Vieira, 2002; Ekici & Yuen, 2004). Um dos critérios básicos de Steiner e Schönbeck (1995) para se

selecionar um agente de biocontrole, potencialmente indutor de resistência, é a ausência de ação direta dele sobre o patógeno.

Neste trabalho, objetivou-se determinar se o método de antibiose *in vitro* poderia ser usado como critério para a seleção de microrganismos para o biocontrole de doenças fúngicas e bacterianas do feijoeiro e, se estes testes poderiam explicar o controle obtido em casa de vegetação. Estes testes foram realizados concomitantemente à seleção massal *in vivo* e, portanto, serão apresentados resultados dos testes de antibiose realizados com os quinhentos isolados, bem como os testes que foram feitos apenas com os isolados UFV-172 (*Bacillus cereus*), UFV-108 (*Pseudomonas putida*) e UFV-75 (*Bacillus cereus*), selecionados em casa de vegetação dentre os 500 isolados, como melhores antagonistas contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Vauterin, Hoste Kersters & Swings e *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris .

## MATERIAL E MÉTODOS

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Os testes foram realizados utilizando-se os patógenos desafiantes *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Pseudomonas viridiflava* (Burkholder) Dowson, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola*, *Erysiphe polygoni* D.C. e *Uromyces appendiculatus* (Pers) Unger.

### **Microrganismos, sua origem e seu cultivo.**

Os procedimentos de isolamento e manutenção dos isolados de procariontes residentes de filoplano e dos patógenos da cultura, utilizados nos ensaios neste artigo, estão descritos no artigo 1 desta tese.

### **Método da dupla camada** (Vidaver *et al.*, 1972)

Em placas de Petri de nove cm de diâmetro com meio 523 (Kado & Heskett, 1970) sólido foram repicados, em pontos equidistantes, cinco isolados de candidatos a antagonistas, seguindo-se à incubação por 24 h a 25°C. Após esse período, as colônias formadas foram expostas a vapores de clorofórmio por uma hora a fim de matar as bactérias e, após a volatilização do produto, cada

placa recebeu uma sobre-camada de meio semi-sólido fundente com um dos patógenos (excetuando-se *Uromyces appendiculatus* e *Erysiphe polygoni*). Foram feitas três repetições de cada candidato a antagonista para cada patógeno.

O preparo da sobre-camada foi feito de acordo com o patógeno desafiante a ser testado. Os patógenos *X. a. pv. phaseoli* e *P. viridiflava*, foram cultivados em tubos de ensaio contendo o meio 523 (Kado & Heskett, 1970) líquido, por 24 h a 28°C. Após esse período, 100 µL foram retirados do tubo com a cultura crescida e em fase exponencial e dispensados em Erlenmeyer contendo 100 mL do mesmo meio, semi-sólido fundente. No caso de *C. lindemuthianum*, culturas foram crescidas em meio de Mathur (Mathur *et al.*, 1950) por 21 dias a 25°C, e o micélio e os esporos formados foram removidos, por meio de pincelamento do meio, utilizando-se pincel estéril e transferidos para Erlenmeyer contendo o mesmo meio semi-sólido fundente. Quanto a *P. griseola*, culturas foram crescidas em meio BDA (Tuite, 1950) por 21 dias a 24°C. Os pedaços de micélio e esporos formados foram transferidos para Erlenmeyer contendo BDA semi-sólido fundente.

Avaliou-se a capacidade de inibição do crescimento micelial por meio da medição do diâmetro médio do halo de inibição, se houvesse, localizado acima de cada antagonista.

### **Inibição de Germinação de esporos**

Os patógenos fúngicos *C. lindemuthianum* e *P. griseola* foram cultivados como descrito no item acima.

Para a obtenção de urediniósporos de *Uromyces appendiculatus*, folhas de feijoeiro cultivar Pérola com pústulas de ferrugem foram colhidas 24 h antes do teste. O mesmo procedimento foi feito para a obtenção de conídios de *Erysiphe polygoni*. Os esporos foram obtidos a partir de pincelamento da área lesionada e estes foram recolhidos em vidro de relógio e armazenados em geladeira a 4°C..

Os candidatos a antagonista foram cultivados em tubos de ensaio com meio 523 sólido inclinado, por 24 h a 28°C. Preparou-se uma suspensão de esporos dos fungos a serem testados em água estéril (Dhingra & Sinclair, 1995), da qual se retirou uma alíquota de 150 µL (concentração de  $5 \times 10^4$  esporos/mL) e transferiu-se essa alíquota para lâmina de vidro escavada. Sobre a suspensão

de esporos, dispensou-se 150 µL de suspensão de células do candidato a antagonista, na densidade óptica de 0,2 de Absorbância ( $A=540\text{nm}$ ) e agitaram-se levemente ambas as suspensões, promovendo a mistura de uma com a outra. As lâminas foram mantidas em incubadora a 25°C por 12h. Utilizou-se água estéril como testemunha. Em seguida, sob microscópio óptico, contou-se o número de esporos germinados e não germinados, num total de 300 esporos em cada lâmina. Foram feitas três repetições de cada candidato a antagonista contra cada patógeno e utilizou-se água em substituição a suspensão de isolados como controle.

Nos ensaios que se seguem, utilizaram-se apenas os isolados UFV-172, UFV-108 e UFV-75, previamente selecionados em casa de vegetação como promissores no controle biológico de *X. a. pv. phaseoli* e *P. griseola*.

#### **Método da placa sobreposta (Dick & Hutchinson, 1966)**

Este método, também conhecido como detecção de compostos voláteis, consistiu da repicagem do antagonista em meio 523 (Kado & Heskett, 1970), no qual a tampa da placa foi substituída pelo fundo de outra placa com meio BDA, ao qual se transferiu disco de micélio do patógeno desafiante *C. lindemuthianum*. As placas foram seladas com parafilme e levadas a incubadora a 25°C, por 15 dias. O mesmo foi feito para *P. griseola*, mas, substituiu-se o disco de micélio por uma suspensão de água esterelizada (concentração de  $5 \times 10^4$  esporos/mL) com esporos do fungo. No tratamento controle, não se adicionou nenhum antagonista às placas de Petri com meio 523. Para cada isolado, prepararam-se três repetições. Avaliou-se a produção de compostos voláteis pela medição do diâmetro médio das colônias formadas.

#### **Produção de sideróforos**

Para determinar se os isolados UFV-75, UFV-108 e UFV-172 eram capazes de produzir sideróforos, foi utilizado o método de Schwynn & Neilands (1987) modificado. Os isolados foram cultivados em Erlenmeyer com 10 mL de meio tripticaseína de soja (TSL), incubadas a 28°C por 48 h e com agitação constante. Decorrido esse tempo, o meio foi centrifugado por 10 minutos a 12.000G. Uma alíquota de um mL do sobrenadante foi tomada e transferida para tubo de ensaio com um mL de solução de Cromo azurol S (CAS). Após 15 minutos, observou-se a viragem da coloração do meio de azul para amarelo-

amarronzado, se havia produção de sideróforo. Caso contrário, a cor azul do meio seria mantida.

**Produção de quitinase (Renwick *et al.*, 1991).**

A fim de determinar se os isolados UFV-75, UFV-108 e UFV-172 produziam ou não quitinase, estes foram semeados em pontos equidistantes da placa de Petri com o meio MLN (Gerhardt, 1994) sem as fontes de carbono e complementado com 8g/L de quitina coloidal como única fonte de carbono,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,78g/L) e ágar (18g/L). As placas foram levadas à incubadora, onde permaneceram por 10 dias a 28°C. Avaliou-se a presença de halos claros ao redor das colônias, que indicavam que os isolados produziram enzimas quitinolíticas. Foram feitas três repetições para cada isolado

**Produção de  $\beta$ -1,3-glucanase (Bakker & Schippers, 1987).**

Adicionou-se ao meio MLN 5g de  $\beta$ -1,3-glucano como única fonte de carbono e este foi complementado com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0,78g/L) e ágar (18g/L). Os isolados foram repicados em pontos equidistantes da placa de Petri, incubados a 28°C por 3 dias e, após esse período, adicionou-se vermelho congo até que a superfície do meio ficasse totalmente recoberta. As placas foram deixadas à temperatura ambiente por 90 minutos e o excesso de corante foi removido. A presença de halo amarelado ao redor da colônia, contrastante com o fundo vermelho, foi o indicativo de teste positivo quanto à produção da enzima.

**Produção de ácido cianídrico (Castric, 1975).**

Os isolados foram repicados para placas de Petri com meio triptsoy-agar (TSA) (1/10) suplementado com 4,4g/L de glicina e 0,3 mM de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,081g/L). As placas foram invertidas e sobre a tampa colocou-se tiras de papel de filtro impregnado com solução de ácido pícrico a 5% e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2%. As tiras de papel apresentavam cor amarela. As placas foram levadas à incubadora por 48h a 28°C. A mudança de coloração do papel de amarelo para marrom-alaranjado foi o indicativo de que o isolado produziu HCN.

## RESULTADOS

### Método da dupla camada

Nos testes de antibiose em dupla camada para *C. lindemuthianum*, *P. griseola*, *X.a.pv. phaseoli* e *P. viridiflava*, dos 500 isolados testados, 411 não produziram nenhum composto antimicrobiano detectável por difusão em ágar. Desses 500 isolados, 45 inibiram o crescimento de *X.a. pv. phaseoli*. Contra *P. viridiflava*, 18 isolados produziram halo de inibição. Em relação à *P. griseola*, dos 500 isolados testados, 29 foram capazes de inibir o crescimento micelial do patógeno. Quanto ao patógeno *C. lindemuthianum*, 29 isolados de 500 foram capazes de inibir o crescimento do fungo. (tabela1).

Quanto aos isolados advindos da seleção massal *in vivo*, o isolado UFV-75 inibiu o crescimento micelial dos fungos testados, inibiu o crescimento de *X. a pv. phaseoli* e não teve efeito sobre *P. viridiflava*. O isolado UFV-108 inibiu o crescimento de *P. viridiflava*, *X. a. pv. phaseoli* e *P. griseola*, mas não teve efeito sobre o crescimento micelial de *C. lindemuthianum*. O isolado UFV-172 não inibiu nenhum dos patógenos testados.

Dentre os 500 isolados testados em dupla camada, apenas 25 inibiram o crescimento de dois ou mais patógenos, sendo que, somente cinco inibiram pelo menos um fungo e uma bactéria e, apenas um isolado foi capaz de inibir os quatro patógenos (UFV-366)

### Inibição de germinação de esporos

Dos 500 isolados testados, 241 isolados apresentaram efeito inibitório da germinação de pelo menos um dos fungos testados. Desses, 18 inibiram a germinação dos conídios *P. griseola*, 43 isolados inibiram a germinação dos conídios de *E. polygoni*, 178 isolados inibiram a germinação dos urediniósporos *U. appendiculatus* e 93 isolados inibiram a germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*. Apenas no ensaio com *C. lindemuthianum* um isolado foi capaz de inibir totalmente a germinação de um fungo (isolado UFV-116). Nos outros ensaios não houve inibição total de germinação dos esporos de nenhum dos patógenos por nenhum outro isolado (tabela 2).

O isolado UFV-108, inibiu a germinação dos urediniósporos de *U. appendiculatus* e dos conídios de *P. griseola* e de *E. polygoni*, mas não inibiu a germinação dos conídios de *C. lindemuthianum*. UFV-75 foi capaz de inibir a

germinação dos esporos de todos os patógenos em níveis distintos. O isolado UFV-172 não inibiu a germinação de nenhum dos patógenos.

Dos 500 isolados testados, somente UFV-11 e UFV-75 inibiram a germinação dos esporos dos quatro patógenos.

Dos 500 isolados, 273 produziram algum efeito inibitório sobre pelo menos um dos patógenos, considerando-se os testes de dupla camada e germinação de esporos. Desses 273 isolados, 36 inibiram pelo menos um patógeno bacteriano e um fúngico (tabela 3).

#### **Método da placa sobreposta**

Nos testes para a determinação da produção de compostos voláteis, o isolado UFV-75 inibiu até 60% o crescimento micelial do fungo *C. lindemuthianum*, quando comparado com o tratamento controle. Não houve efeito dos isolados UFV-172 e UFV-108 sobre o patógeno, comparando-os com o tratamento com água (Figura 1). O isolado UFV-75 foi eficiente em inibir o crescimento de *P. griseola* em 85%, quando comparado com o tratamento controle (Figura 2).

#### **Produção de sideróforos**

Para os três isolados testados foi detectada a produção de sideróforos, embora não se tenha quantificado e determinado que tipo de sideróforo foi produzido.

#### **Produção de quitinase**

No teste para determinação da produção da enzima quitinase, o isolado UFV-75 foi o único capaz de degradar a quitina e produzir halo, com este atingindo diâmetro médio de 2,1 cm.

#### **Produção de $\beta$ -1,3-glucanase**

Não se observou a produção de halo amarelo ao redor das colônias de em nenhum dos isolados. Portanto, nenhum destes foi capaz de produzir a enzima  $\beta$ -1,3-glucanase.

#### **Produção o ácido cianídrico**

Somente isolado UFV-75 foi capaz de produzir ácido cianídrico.

#### **Identificação dos melhores isolados.**

Os isolados UFV-172, UFV-75 foram identificados com emprego de sequenciamento do RNA16S (Department of Genetics – Genome Research

Unit. Universitat Kaiserslautern, Alemanha). UFV-172 e UFV-75 foram identificados como espécies de *Bacillus cereus*. O isolado UFV-108 foi identificado por análise de ácidos graxos como sendo *Pseudomonas putida*.

## DISCUSSÃO

Pode-se afirmar com base nos resultados que, a antibiose foi um fenômeno bastante comum, no que diz respeito ao controle “in vitro”, uma vez que 54,6% dos isolados manifestaram algum efeito inibitório sobre algum dos patógenos testados. Por outro lado, é possível sugerir que os mecanismos que estão envolvidos no controle de bactérias e fungos devam ser diferentes, pois nos testes de antibiose em camada dupla, a porcentagem de isolados capazes de inibir tanto fungos quanto bactérias foi baixa (7,2%). Quando se comparam os isolados que tiveram efeito inibitório em dupla camada contra bactérias e os que inibiram a germinação de fungos, apenas 14,2 % destes foram eficientes em ambos os casos. Halfeld-Vieira (2002) obteve resultados semelhantes, quando testou isolados obtidos de tomateiro contra diferentes patógenos da cultura. Nos testes de antibiose, 67 % dos isolados apresentaram algum efeito sobre os patógenos e apenas um isolado foi capaz de inibir concomitantemente *Alternaria. solani*, *X. vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

O efeito dos isolados sobre a germinação dos esporos foi bastante significativa se considerarmos que, dos 252 isolados que apresentaram efeito inibitório sobre os patógenos fúngicos quando se agrega os testes de dupla camada e inibição de germinação de esporos, 241 destes inibiram a germinação dos esporos. Estes resultados demonstram a eficiência do teste de germinação em gota, quando comparado com o teste de inibição do crescimento micelial. Possivelmente este fato possa ser explicado pelos estágios iniciais da germinação do esporo, quando absorve grande quantidade de água (Alexopoulos, *et al.* 1996) e, com esta, absorve metabólicos tóxicos, produzidos pelas bactérias. Deve-se considerar também que, no método de germinação de esporos, há o contato direto do patógeno com o produto ou produtos tóxicos produzidos pela bactéria, sem barreiras físicas. Já no teste de dupla camada o meio de cultura é um obstáculo à difusão de compostos. Adicionalmente, a

bactéria antagonista está viva, o que possibilita a essa produzir e excretar continuamente o composto tóxico, o que intensifica o efeito inibitório.

Para alguns pesquisadores, a antibiose é o mecanismo responsável pela eficácia de controle de muitas doenças (Guetsky *et al.*, 2002; Jock *et al.*, 2002; Johnson, *et al.*, 1999; Kempf & Wolf, 1989) e deve ser considerada como um critério de seleção (Montesinos *et al.*, 1996). Por outro lado, existem aqueles que consideram inadequado a seleção *in vitro* como método primário de seleção, pois arrisca-se a descartar isolados que promovam o controle mediante mecanismos que não os de antibiose (Halfeld-Vieira, 2002; Levy & Carmeli, 1995).

Para uma boa seleção é necessário isolar o maior número de microrganismos, dos mais diferentes locais possíveis, a fim de se abranger diferentes condições climáticas e culturais, aumentando-se as chances de se obter um ou mais isolados que sejam hábeis no propósito de controle. Por outro lado, isso obriga a quem opta pelo método *in vivo* a ter uma área consideravelmente grande, por causa do grande número de repetições que seriam necessárias para se testar cada isolado. Este problema se agrava quando se pensa em culturas perenes, como *Citrus*, por exemplo, onde o tempo que a planta permanece em viveiro é bastante longo (Pabitra *et al.*, 1996; Andrews, 1992a; Andrews, 1992b.). Nesse aspecto, a seleção massal *in vitro* leva vantagem, pois demanda pouco tempo e pouco espaço para a sua realização.

Em ensaios realizados com patógenos de feijoeiro em casa de vegetação, Vieira-Júnior e colaboradores selecionaram a partir dos mesmos 500 isolados, os que promoveram maior controle sobre *X.a. pv. phaseoli* e *P. griseola*. (Vieira-Júnior, *et al.*, 2004a; Vieira-Júnior, *et al.*, 2004b). Os isolados UFV-172, UFV-75 e UFV-108, foram selecionados como promissores e re-testados contra os mesmos patógenos, repetindo os resultados. Nos testes *in vitro* de dupla-camada e germinação de esporos, os isolados UFV-108 e UFV-75 apresentaram efeito sobre ambos os patógenos, entretanto, o isolado UFV-172 não apresentou efeito inibitório contra nenhum dos patógenos testados. Entretanto, ele foi o mais eficaz no controle de *X.a. pv. phaseoli* em casa de vegetação.

Portanto, se utilizássemos apenas os ensaios de antibiose *in vitro* como método de seleção, certamente UFV-172 teria sido descartado, pela sua ineficiência de controle nos ensaios *in vitro*. Halfeld-Vieira (2002) descreve fenômeno semelhante, pois o isolado UFV-IEA6 (também *Bacillus cereus*), não foi eficiente contra os patógenos testados *in vivo*, mas o foi em testes na casa de vegetação e de campo. Teríamos, por outro lado, considerado os isolados UFV-11, UFV-97, UFV-116, UFV-132, UFV-366 e UFV-411 como eficazes, falhando no objetivo final que é o controle *in vivo*, onde esses isolados não chegaram a ser nem medianamente eficientes no controle de *X.a. pv. phaseoli* e *P. griseola* (Vieira-Júnior, 2004a; Vieira-Júnior, 2004b)

Não obstante, teria sido selecionado o isolado UFV-75, que em todos os testes só não inibiu *P. viridiflava* em teste de dupla-camada. Também teria sido selecionado o isolado UFV-108, que só não foi efetivo em inibir *C. lindemuthianum*.

Portanto sugere-se que a utilização dos ensaios *in vitro* seja sempre associada à seleção massal *in vivo* e, na necessidade de se optar por um das duas, deva-se optar pela segunda, deixando a primeira como uma ferramenta auxiliar, para se explicar e mesmo confirmar os efeitos obtidos *in vivo*.

Os testes *in vitro* ajudaram a elucidar, ao menos em parte, o desempenho alcançado pelos isolados UFV-108 e UFV-75, especialmente o último, pois excetuando-se o teste para a produção de  $\beta$ -1,3-glucanase, o isolado apresentou, diferentes mecanismos de controle. O isolado UFV-75 em especial é forte candidato a se tornar um agente de biocontrole numa formulação comercial, já que além amplo espectro de ação *in vivo*, o isolado apresenta diferentes mecanismos de controle, o que possivelmente dificultaria a ocorrência de populações resistentes dos patógenos aos produtos tóxicos produzidos pelo isolado.

O isolado UFV-75 foi identificado como uma espécie do gênero *Bacillus* (*B. cereus*), que compreende um grupo de bactérias bastante heterogêneo, e já foi relatado habitando tanto o solo quanto a água (Allen *et al.*, 1983), na rizosfera e no filoplano das mais diferentes plantas cultivadas (Ercolani, 1978; Morris *et al.*, 1981; Halfeld-Vieira, 2002), além de muitas espécies terem sido relatadas como agentes de biocontrole de diversas doenças de plantas, tanto no

solo quanto na parte aérea, sendo aplicadas em pulverizações foliares ou incorporados à sementes por microbiolização, ou em irrigação de solo (Amorim, 1997; Luz, 1994; Rovira, 1985; Wood, 1951). Some-se a isso o fato de que bactérias desse gênero são produtoras de endósporos, o que favorece a sobrevivência nas mais diferentes condições de ambiente, sendo tolerantes à dessecação, radiação ultra-violeta, além de produzir uma ampla gama produtos tóxicos, com atividade antimicrobiana (Morris *et al.*, 1981)

O mesmo pode ser dito do isolado UFV-108, identificado como *P. putida*, uma espécie que tem sido estudada com bastante intensidade para fins de controle biológico de doenças de plantas, tanto no solo como na parte aérea das plantas (Blakeman e Brodie, 1977). *P. putida* também tem sido relatada habitando solo e parte aérea de plantas, competindo por nutrientes e nichos ecológicos específicos (Blakeman e Brodie, 1977; Byrne *et al.*, 2005; Harris e Adkins, 1999) além de ser produtora de compostos antimicrobianos como antibióticos (Howell e Stipanovic, 1979) e sideróforos, compostos de baixo peso molecular, com alta afinidade pelo íon férrico ( $Fe^{3+}$ ) em baixas concentrações, removendo-o do meio e inibindo o crescimento de outros microrganismos (Neilands, 1981).

Essas informações sugerem a potencialidade dos isolados UFV-75, UFV-108 e UFV-172 como futuros agentes de biocontrole de doenças de parte aérea de doenças do feijoeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. A.; AUSTIN, B. & COLWELL, R.R. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a fresh water fishery. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p.2043-2062, 1983.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, C. W. & BLACKWEL, M. **Introductory Mycology**, 4<sup>o</sup> ed., New York, Wiley & Sons, Inc., 1996, 869p.
- AMORIN, E. P. R. **Controle biológico de *Phytophthora nicotianae parasitica* e *P. citrophthora* em plântulas de Citros**. Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, Tese (Doutorado), 111p., 1997.

- ANDREWS, J.A. Biological control in the phyllosphere: realistic goal or false hope? **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.12, p. 300-307, 1990.
- ANDREWS, J. H. The screening of microorganisms antagonistic to phytopathogens. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, n.1, p.165-174, 1992.
- ANDREWS, J. H. Biological control in the phyllosphere. **Annual Review of Phytopathology**. v. 30, p. 603-635. 1992 b.
- BAKKER, A. W. & SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 451-457, 1987.
- BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna, Embrapa-CNPDA, p. 223-236, 1991.
- BLAKEMAN, J. P. & BRODIE, I. D.S. Competition for nutrients between epiphytic micro-organisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. **Physiological Plant Pathology**, v.10, p.29-42, 1977.
- BYRNE, J.M.; DIANESE, A.C.; JI, P.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D. A. LOUWS, F.J.; MILLER, S.A.; JONES, J.B. & WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under weld conditions at several locations in North América. **Biological Control**, v.32, p. 408-418, 2005.
- CASTRIC, P. A. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, p. 613-618, 1975.
- CATTELAN, A. J. **Métodos Quantitativos para a Determinação de Características Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**, Londrina, Embrapa-Soja, 1999, 36p.
- COOK, R. J. & BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**, St. Paul, APS Press, 1989, 539p.
- DHINGRA, O. D.& SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**, Boca Raton, CRC Press, 1995, 355p.
- DICK, C. M. & HUTCHINSON, S. A. Biological activity of volatile fungal metabolites. **Nature**, v. 211, p. 868, 1966.
- EKICI, O. K. & YUEN, G. Y. Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. **Biological Control**, v. 30, n. 4, p. 446-455, 2004.

- ERCOLANI, G.L. *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. **Journal of General Microbiology**, v. 109, p.245-257, 1978.
- FERNANDO, W. G. D.; WATSON, A. K. & PAULITZ, T. C. The role of *Pseudomonas* spp. and competition for carbon, nitrogen and iron in the enhancement of appressorium formation by *Colletotrichum coccodes* on velvetleaf. **European Journal of Plant Pathology**, v.102, p.1-7, 1996.
- GERHARDT, P. (Ed.). **Methods for General and Molecular Bacteriology**, Washington, American Society of Microbiology, 1994, 791p.
- GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E. & DINNOOR, A. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. **Phytopathology**, v. 92, n.9, p. 976-985, 2002.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Tese (Doutorado), 98p., 2002.
- HOWELL, C. R. & STIPANOVIC, R. D. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with antibiotic produced by bacterium. **Phytopathology**, v.69, p.480-482, 1979.
- HARRIS, A.R. & ADKINS, P.G. Versatility of fungal and bacterial isolates for biological control of damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. **Biological Control**, v. 15, p.10–18, 1999.
- ISHMARU, C.A.; KLOS, E.J. & BRUBAKER, R.R. Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. **Phytopathology**, v. 78, p. 746-750, 1988.
- JOCK, S.; VOLKSCH, B.; MANSVELT, L. & GEIDER, K. Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 221, n. 2, p, 247-252, 2002.
- JOHNSON, K. B. & Di LEONE, J. A. Effect of antibiosis on antagonistic dose-plant- disease-response relationships for biological control of crown gall of tomato and cherry. **Phytopathology**, v. 89, p. 974-980, 1999.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969 – 979, 1970.
- KEMPF, H. J. & WOLF, G. *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* on wheat. **Phytopathology**, v.79, n.9, p. 990-994, 1989.

- KLOEPPER, J. W.; LEONG, J.; TEINTZE, M. & SCROTH, M. N. Enhanced plant growth-promoting by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. **Nature**, v. 286, p. 885-886, 1980.
- LEVY, E. & CARMELI, S. Biological control of plant pathogens by antibiotic-producing bacteria. **Allelopathy Organisms, Processes and Applications**, v. 41, p.136-142, 1995.
- LUZ, W.C. Microbiolização de sementes para o controle da podridão comum das raízes e dos patógenos e seu efeito no rendimento do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.144-148, 1994.
- MATHUR, R. S.; BARNETT, H.L.; LILLY V. G.; Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. **Phytopathology**, v.40, n.2, p.104, 1950
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p369-409, 1993.
- MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; OPHIR, Y. & BEER, S.V. Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions. **Phytopathology**, v. 48, n. 8, p. 856-863, 1996.
- NEILANDS, J. B. Microbial iron compounds. **Annual Review of Biochemistry**, v. 50, p.715-731, 1981.
- NORRIS, J.R.; BERKELEY, R.C.W.; LOGAN, N.A.; O'DONNELL, A.G. The genera *Bacillus* and *Sporolietobacillus*. In: Starr, M.P.; STOLP. H.; TRUPER, H.G.; BALOWS, A.; SCHLEGEL, H.G. (eds.) **The Prokaryotes: a handbook on habitsats, isolation and identification of bacteria**, Berlin, Spinger-Verlag, 1981, p. 1711-1742.
- PABITRA, K.; BORA, L. C.; BHAGABATI, K. N. & KALITA, P. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, v. 49, n.2, p.234-237, 1996.
- RENWICK, A.; CAMPBELL, R. & COE, S. Assessment of *in vivo* screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, v. 40, p.524-532, 1991.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**, Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2001, 297p.
- ROVIRA, A. D. Manipulation of the rhizosphere microflora to increase plant production. In: LENG, R.A.; BAKER, J.S.F.; ADAMS, D.B. & HUTCHINSON, K. J. (eds.) **Biotechnology and recombinant DNA**

- Technology in animal production industries**, Armidal, University of New England Publishing. 1985, p.185-187.
- SCHWYNN, B & NEILANDS, J. B. Universal chemical analysis for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p 47-56, 1987.
- STEINER, U & SCHONBECK, F. Induced resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT & KUC, J. (Ed.). **Induced Resistance to Disease in Plants- Developments in Plant Pathology**, v.4, Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, 1995.
- TUITE, J. **Plant Pathological Methods**, Minneapolis, Burgess Publisher Co., 1969, 250p.
- VIDAVER, A. K.; MATHYS, M. L.; THOMAS, M. E. & SCHUSTER, M. L. Bacteriocins of phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *P. phaseolicola*, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, p. 705-713, 1972.
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, G. S.; LANNA FILHO, R. & MENDONÇA, H. L. Residentes de filoplano bacterianos como agentes de biocontrole do cretamento bacteriano comum do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 76, 2004a (Resumo).
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, G. S. & LANNA FILHO. Procariotas residentes de filoplano como agentes de biocontrole da mancha angular do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 76, 2004b (Resumo).
- WOOD, R. K. S. The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms II. The control of *Rhizoctonia solani*. **Annals of Applied Biology**, v. 38, p. 217, 1951.
- ZHANG, Z. & YUEN, G.Y. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v. 90, p. 384-389, 2000.

Tabela 1 – Diâmetro médio de halo de inibição dos patógenos testados contra os 500 isolados de residentes de filoplano em ensaio de dupla-camada\*.

Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno			
	Xap	Pv	Cl	Pg		Xap	Pv	Cl	Pg		Xap	Pv	Cl	Pg		Xap	Pv	Cl	Pg
3	0,0	0,0	0,0	1,0	91	1,2	0,0	0,0	0,0	221	5,5	0,0	0,0	0,0	366	2,7	1,0	2,8	0,9
4	0,0	0,0	0,0	0,6	95	0,0	0,0	1,6	2,2	226	0,0	0,0	2,0	0,9	372	0,0	0,4	0,0	0,0
7	1,8	0,0	0,0	0,0	96	0,0	0,0	0,0	1,2	240	0,0	0,0	6,0	0,0	382	0,0	0,0	2,1	2,2
10	2,6	0,0	0,0	0,0	97	2,1	0,0	5,2	5,9	245	5,9	0,0	0,0	0,0	399	1,2	0,0	0,0	0,0
11	0,0	0,0	6,3	6,1	103	2,9	0,0	0,0	0,0	256	0,0	0,0	2,2	0,0	400	1,9	0,0	0,0	0,0
13	2,1	0,0	0,0	0,0	108	6,5	6,0	0,0	0,0	257	2,3	0,0	1,8	0,0	405	2,8	0,0	0,0	0,0
15	1,7	0,0	0,0	0,0	113	0,0	0,0	2,0	1,0	258	1,8	0,0	0,0	0,0	407	2,2	0,0	0,0	0,0
19	4,8	0,0	0,0	0,0	116	6,1	5,2	4,4	0,0	260	2,1	0,0	0,0	0,0	408	2,5	2,9	0,0	0,0
26	0,0	0,0	2,0	2,2	121	0,0	1,0	0,0	0,0	264	0,0	0,0	1,0	1,1	411	0,0	0,0	5,7	6,0
29	1,9	0,0	0,0	0,0	130	5,7	0,0	0,0	0,0	270	0,0	2,2	0,0	0,0	438	0,0	0,5	0,0	0,0
42	0,0	6,0	0,0	0,0	132	0,0	0,4	0,0	0,0	274	0,0	0,0	1,2	2,0	444	0,0	5,9	0,0	0,0
43	5,8	0,0	0,0	0,0	140	0,0	0,7	0,0	0,0	275	6,5	0,0	2,6	2,2	441	1,0	0,0	0,0	0,0
44	0,0	5,4	0,0	0,0	151	0,0	0,0	0,5	0,0	285	1,0	0,0	0,0	0,0	451	0,0	0,0	5,9	0,0
49	0,0	0,0	2,0	1,3	152	2,3	0,0	0,0	0,0	287	0,0	0,0	4,4	0,0	470	0,0	0,0	6,0	5,0
52	0,0	0,0	1,1	2,2	161	1,5	0,0	0,0	0,0	298	2,9	0,0	0,0	0,0	476	6,0	0,0	0,0	0,0
54	5,2	0,0	0,0	0,0	162	1,9	0,0	0,0	0,0	299	0,0	0,0	0,0	1,0	478	0,0	2,2	0,0	0,0
56	0,0	0,0	6,0	0,0	185	0,0	0,0	0,0	1,1	300	0,0	0,0	0,0	0,4	483	0,0	0,0	1,0	2,1
57	0,0	0,0	0,0	5,3	186	0,0	0,0	1,1	1,3	305	0,0	0,0	1,0	2,8	485	4,0	0,0	0,0	0,0
58	0,0	0,0	4,9	5,2	190	5,5	0,0	0,0	0,0	326	2,2	0,0	0,0	0,0	487	0,0	0,0	0,3	1,0
61	0,0	4,0	0,0	0,0	191	0,0	1,1	0,0	0,0	327	2,6	0,0	0,0	0,0	496	0,6	0,0	0,0	0,0
74	0,0	0,0	0,0	1,9	209	4,9	0,0	0,0	0,0	336	5,5	0,0	0,0	0,0					
75	2,9	0,0	5,2	6,0	211	1,2	5,3	0,0	0,0	337	4,1	0,0	0,0	0,0					
81	1,1	0,0	0,0	0,0	212	2,2	0,0	0,0	0,0	365	0,0	2,0	0,0	0,0					

\* São apresentados apenas os isolados que tiveram algum inibitório sobre pelo menos um dos patógenos testados  
 Legendas: Cl - *Colletotrichum lindemuthianum*; Pg - *Phaeoisariopsis griseola*; Pv - *Pseudomonas viridiflava*; Xap - *Xanthomonas axonopodis pv phaseoli*.

Tabela 2 – Porcentagem média de inibição de germinação de esporos de patógenos do feijoeiro testados contra 500 isolados de residentes de filoplano da cultura em ensaios de germinação em lâmina escavada\*

Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno			
	Ua	Ep	Pg	Cl		Ua	Ep	Pg	Cl		Ua	Ep	Pg	Cl		Ua	Ep	Pg	Cl
1	0,0	0,0	0,0	0,0	55	50,0	0,0	0,0	0,0	116	80,2	66,7	0,0	100	177	51,2	78,1	0,0	0,0
2	0,0	65,3	0,0	0,0	56	12,2	0,0	0,0	0,0	119	12,2	0,0	0,0	0,0	178	12,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	10,3	0,0	57	10,0	0,0	0,0	0,0	120	26,4	0,0	0,0	0,0	179	10,0	0,0	0,0	0,0
4	0,0	0,0	43,2	0,0	58	3,2	0,0	0,0	0,0	124	60,0	23,2	0,0	0,0	180	54,2	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	0,0	77,3	59	12,8	0,0	0,0	0,0	126	34,0	0,0	0,0	0,0	183	0,0	0,0	0,0	67,9
7	0,0	80,9	0,0	65,4	61	0,0	0,0	0,0	10,2	127	13,9	0,0	0,0	52,1	184	0,0	0,0	19,6	77,3
8	0,0	0,0	0,0	81,2	62	0,0	0,0	0,0	23,3	128	0,0	0,0	0,0	56,3	186	60,3	0,0	0,0	0,0
9	0,0	82,3	0,0	66,9	63	0,0	0,0	0,0	45,3	129	0,0	0,0	0,0	76,3	187	2,2	0,0	0,0	0,0
10	0,0	0,0	0,0	77,3	67	79,7	0,0	0,0	0,0	130	45,9	0,0	0,0	89,2	189	56,8	0,0	0,0	34,7
11	46,7	43,2	18,9	79,9	68	70,2	0,0	0,0	0,0	131	49,9	0,0	0,0	78,9	190	0,0	0,0	0,0	44,4
12	32,2	0,0	0,0	88,7	69	55,7	0,0	0,0	0,0	132	41,0	34,1	0,0	80,2	191	0,0	0,0	0,0	12,2
13	11,2	0,0	0,0	0,0	74	0,0	0,0	70,2	0,0	133	12,0	40,4	0,0	58,2	193	12,0	2,7	0,0	0,0
14	19,9	0,0	0,0	0,0	75	79,9	45,2	88,3	95,3	134	10,9	12,2	0,0	51,1	194	3,9	0,0	0,0	0,0
15	34,0	0,0	0,0	0,0	76	53,2	0,0	0,0	0,0	135	0,0	0,0	0,0	90,1	195	0,0	0,0	0,0	70,0
16	66,9	0,0	0,0	0,0	78	0,0	0,0	0,0	6,6	139	32,2	0,0	0,0	0,0	196	45,2	66,7	0,0	81,2
17	70,9	0,0	0,0	0,0	79	0,0	0,0	0,0	12,3	140	41,6	0,0	0,0	23,3	197	44,0	2,2	0,0	52,0
18	11,2	0,0	0,0	34,2	80	0,0	0,0	0,0	24,2	141	23,1	0,0	0,0	0,0	198	36,2	0,0	0,0	67,4
19	45,7	0,0	0,0	0,0	83	34,2	0,0	0,0	80,8	142	0,0	0,0	0,0	21,1	199	49,0	0,0	0,0	88,1
20	5,2	0,0	0,0	0,0	84	13,2	0,0	0,0	0,0	144	69,7	0,0	0,0	0,0	200	79,6	71,0	0,0	0,0
24	2,3	80,8	0,0	0,0	85	1,9	0,0	0,0	0,0	147	0,0	0,0	0,0	70,7	228	0,0	0,0	0,0	70,7
25	6,2	0,0	0,0	0,0	87	0,0	0,0	0,0	56,8	148	0,0	0,0	0,0	66,5	231	12,0	66,8	0,0	0,0
26	10,3	0,0	0,0	0,0	88	0,0	0,0	0,0	70,4	149	0,0	0,0	0,0	56,5	232	34,1	0,0	0,0	0,0
27	25,1	0,0	0,0	0,0	89	0,0	0,0	0,0	66,4	150	0,0	0,0	0,0	89,8	233	44,0	0,0	0,0	0,0
29	0,0	0,0	0,0	34,0	90	0,0	34,4	0,0	0,0	151	67,9	70,4	0,0	0,0	250	80,2	81,5	0,0	0,0
30	0,0	0,0	0,0	23,0	92	67,9	0,0	0,0	0,0	152	78,2	21,1	0,0	0,0	256	35,0	0,0	72,2	93,2
31	0,0	0,0	0,0	11,2	93	70,1	0,0	0,0	88,1	153	77,2	0,0	0,0	0,0	260	0,0	0,0	0,0	34,2
32	40,4	0,0	0,0	0,0	94	59,3	0,0	34,0	0,0	155	23,1	0,0	0,0	0,0	262	37,9	0,0	0,0	0,0
33	49,2	0,0	0,0	0,0	95	23,9	0,0	0,0	0,0	156	2,7	0,0	0,0	67,9	263	12,0	12,2	0,0	0,0
34	12,2	0,0	0,0	0,0	96	75,2	0,0	0,0	0,0	157	10,0	0,0	0,0	0,0	264	9,2	21,9	0,0	0,0
39	85,0	0,0	0,0	78,7	97	55,0	0,0	66,8	0,0	158	66,9	0,0	0,0	0,0	266	0,0	0,0	37,9	0,0
41	23,2	0,0	0,0	0,0	100	0,0	0,0	0,0	11,1	159	27,0	0,0	0,0	0,0	267	77,0	45,2	0,0	0,0
42	2,9	0,0	0,0	0,0	101	12,7	0,0	0,0	0,0	160	14,2	0,0	0,0	0,0	269	0,0	0,0	0,0	70,7
43	1,4	0,0	0,0	0,0	102	14,9	0,0	0,0	0,0	161	41,5	0,0	0,0	89,7	270	0,0	0,0	0,0	74,4
44	33,3	0,0	0,0	0,0	104	66,1	0,0	0,0	0,0	164	78,3	0,0	0,0	0,0	271	0,0	0,0	0,0	52,0
45	45,0	0,0	0,0	23,2	105	73,0	0,0	0,0	0,0	166	78,2	60,0	0,0	0,0	282	12,0	0,0	0,0	0,0
46	0,0	0,0	0,0	227	108	84,1	76,9	80,2	93,9	167	54,2	54,1	0,0	0,0	283	70,0	0,0	0,0	0,0
47	0,0	0,0	0,0	12,0	109	76,6	0,0	0,0	0,0	168	55,0	0,0	0,0	0,0	286	11,0	0,0	0,0	0,0
52	0,0	0,0	0,0	65,4	110	56,2	0,0	0,0	0,0	176	60,0	0,0	0,0	0,0	287	2,2	0,0	0,0	0,0

\* São apresentados apenas os isolados que tiveram algum inibitório sobre pelo menos um dos patógenos testados

Legendas: Cl - *Colletotrichum lindemuthianum*; Ep - *Erysiphe polygoni*; Pg - *Phaeoisariopsis griseola*; Ua - *Uromyces appendiculatus*.

Tabela 2 (Cont.) – Porcentagem média de inibição de germinação de esporos de patógenos do feijoeiro testados contra 500 isolados de residentes de filoplano da cultura em ensaios de germinação em lâmina escavada\*.

Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno				Isolado	Patógeno			
	Ua	Ep	Pg	Cl		Ua	Ep	Pg	Cl		Ua	Ep	Pg	Cl		Ua	Ep	Pg	Cl
<b>288</b>	60,0	0,0	0,0	0,0	<b>337</b>	0,0	0,0	0,0	69,2	<b>395</b>	2,0	0,0	0,0	0,0	<b>467</b>	26,2	0,0	0,0	0,0
<b>289</b>	0,5	0,0	0,0	0,0	<b>343</b>	38,2	0,0	0,0	0,0	<b>396</b>	34,9	0,0	0,0	0,0	<b>469</b>	0,0	0,0	0,0	13,7
<b>296</b>	1,0	0,0		0,0	<b>344</b>	24,0	0,0	0,0	0,0	<b>400</b>	70,4	0,0	0,0	80,9	<b>470</b>	0,0	0,0	0,0	10,0
<b>297</b>	6,0	0,0	80,1	0,0	<b>348</b>	57,8	0,0	0,0	0,0	<b>410</b>	78,9	0,0	0,0	0,0	<b>471</b>	45,2	0,0	0,0	31,8
<b>298</b>	26,8	0,0	0,0	0,0	<b>351</b>	12,3	0,0	0,0	23,8	<b>411</b>	84,9	81,0	0,0	97,9	<b>472</b>	23,1	0,0	0,0	0,0
<b>299</b>	30,1	0,0	0,0	0,0	<b>357</b>	20,0	0,0	0,0	0,0	<b>412</b>	79,2	0,0	0,0	0,0	<b>473</b>	12,6	0,0	0,0	0,0
<b>301</b>	33,3	0,0	0,0	0,0	<b>358</b>	1,6	0,0	45,3	0,0	<b>413</b>	0,0	0,0	0,0	82,0	<b>476</b>	34,0	0,0	0,0	0,0
<b>302</b>	0,0	53,2	0,0	0,0	<b>359</b>	2,9	0,0	56,3	0,0	<b>414</b>	0,0	0,0	0,0	69,1	<b>477</b>	24,0	1,9	0,0	0,0
<b>303</b>	78,7	0,0	0,0	0,0	<b>360</b>	0,9	0,0	0,0	0,0	<b>417</b>	34,0	0,0	82,2	0,0	<b>483</b>	12,0	0,0	0,0	34,0
<b>304</b>	78,6	0,0	0,0	0,0	<b>361</b>	2,0	0,0	0,0	0,0	<b>418</b>	12,0	0,0	0,0	21,6	<b>484</b>	10,2	0,0	0,0	0,0
<b>306</b>	0,0	0,0	0,0	12,2	<b>362</b>	34,0	0,0	0,0	0,0	<b>419</b>	6,0	0,0	0,0	0,0	<b>485</b>	32,8	10,2	0,0	0,0
<b>307</b>	12,0	0,0	0,0	22,6	<b>365</b>	0,0	0,0	0,0	70,8	<b>420</b>	34,0	0,0	0,0	0,0	<b>486</b>	46,2	0,0	0,0	0,0
<b>308</b>	34,0	0,0	0,0	1,2	<b>366</b>	0,0	85,0	0,0	88,8	<b>423</b>	78,2	0,0	0,0	0,0	<b>487</b>	50,0	55,5	0,0	0,0
<b>311</b>	34,0	45,8	0,0	0,0	<b>367</b>	0,0	0,0	0,0	80,2	<b>433</b>	68,9	0,0	0,0	45,2	<b>488</b>	44,4	18,2	24,5	0,0
<b>312</b>	50,0	65,2	0,0	0,0	<b>370</b>	82,0	81,0	0,0	0,0	<b>424</b>	67,9	0,0	0,0	0,0	<b>489</b>	26,0	0,0	57,2	0,0
<b>313</b>	8,2	0,0	0,0	0,0	<b>372</b>	0,0	0,0	0,0	81,2	<b>425</b>	80,0	76,2	0,0	76,6	<b>492</b>	26,7	0,0	0,0	0,0
<b>314</b>	77,0	56,6	0,0	0,0	<b>379</b>	45,0	66,1	0,0	67,9	<b>429</b>	23,0	0,0	0,0	56,9	<b>493</b>	0,0	80,8	0,0	0,0
<b>316</b>	0,0	0,0	0,0	14,0	<b>380</b>	23,0	0,0	0,0	0,0	<b>430</b>	5,9	0,0	0,0	87,2	<b>496</b>	33,6	0,0	0,0	0,0
<b>317</b>	0,0	0,0	0,0	10,4	<b>381</b>	12,0	0,0	0,0	0,0	<b>432</b>	78,0	0,0	0,0	0,0	<b>497</b>	49,8	66,3	0,0	0,0
<b>318</b>	0,0	0,0	0,0	40,9	<b>382</b>	49,0	70,0	0,0	0,0	<b>438</b>	13,9	0,0	0,0	67,2	<b>498</b>	50,0	0,0	0,0	88,2
<b>323</b>	0,0	0,0	0,0	43,2	<b>383</b>	0,0	0,0	0,0	12,0	<b>441</b>	2,0	0,0	0,0	78,3					
<b>326</b>	23,0	0,0	0,0	0,0	<b>390</b>	1,2	0,0	0,0	0,0	<b>456</b>	0,0	0,0	34,2	0,0					
<b>336</b>	0,0	0,0	0,0	60,6	<b>394</b>	40,2	0,0	0,0	0,0	<b>459</b>	0,0	0,0	0,0	11,0					

\* São apresentados apenas os isolados que tiveram algum inibitório sobre pelo menos um dos patógenos testados

Legendas: Cl - *Colletotrichum lindemuthianum*; Ep - *Erysiphe polygoni*; Pg - *Phaeoisariopsis griseola*; Ua - *Uromyces appendiculatus*.

Tabela 3 – Isolados de procariontes residentes de filoplano do feijoeiro que foram capazes de inibir o crescimento e/ou germinação de pelo menos um patógeno fúngico e um bacteriano

Isolado	Inibição em dupla camada				Inibição de germinação de esporos				Isolado	Inibição em dupla camada				Inibição em dupla camada			
	Patógenos				Patógenos					Patógenos				Patógenos			
	Xap	Pv	Cl	Pg	Ua	Ep	Pg	Cl		Xap	Pv	Cl	Pg	Ua	Ep	Pg	Cl
7	I	NI	NI	NI	NI	I	NI	I	191	NI	I	NI	NI	NI	NI	NI	I
10	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I	260	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I
15	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI	287	NI	I	NI	NI	I	NI	NI	NI
19	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI	270	NI	I	NI	NI	NI	NI	NI	I
29	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I	275	I	NI	I	I	NI	NI	NI	NI
42	NI	I	NI	NI	I	NI	NI	NI	298	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI
43	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI	326	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI
44	NI	I	NI	NI	I	NI	NI	NI	336	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I
61	NI	I	NI	NI	NI	NI	NI	I	337	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I
75	I	NI	I	I	I	I	I	I	365	NI	I	NI	NI	NI	NI	NI	I
97	I	NI	I	I	I	NI	I	NI	366	I	I	I	I	NI	I	NI	NI
108	I	I	NI	NI	I	I	I	I	372	NI	I	NI	NI	NI	NI	NI	I
116	I	I	I	NI	I	I	NI	I	400	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	I
130	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	I	438	NI	I	NI	NI	I	NI	NI	NI
132	NI	I	NI	NI	I	NI	NI	I	441	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI
140	NI	I	NI	NI	I	NI	NI	I	476	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI
161	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI	485	I	NI	NI	NI	I	I	NI	NI
190	I	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I	496	I	NI	NI	NI	I	NI	NI	NI

Legendas: Cl - *Colletotrichum lindemuthianum*; Ep - *Erysiphe polygoni*; Pg - *Phaeoisariopsis griseola*; Pv - *Pseudomonas viridiflava*; Ua – *Uromyces appendiculatus*; Xap - *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*.

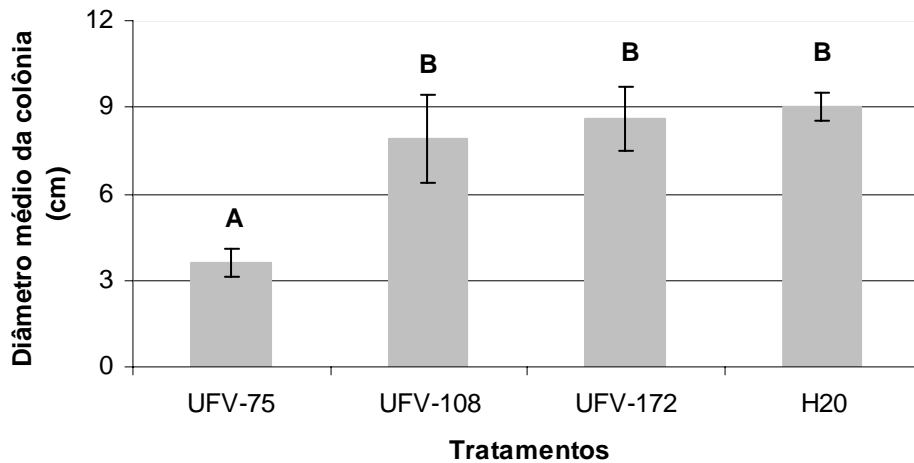


Figura 1-Diâmetro máximo médio de colônias de *Colletotrichum lindemuthianum* em placas de Petri em ensaio de produção de compostos voláteis em placas sobrepostas. Médias seguidas de mesma não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os traços representam o desvio padrão.

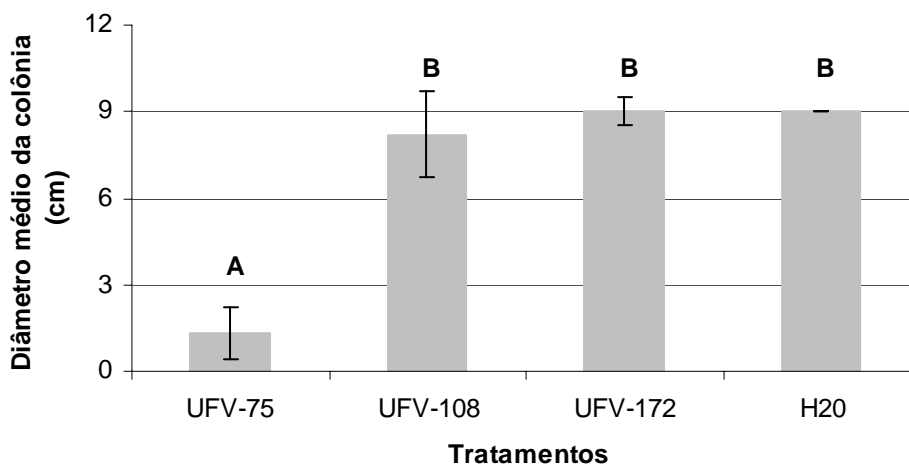


Figura 2-Diâmetro máximo médio de colônias de *Phaeoisariopsis griseola* em placas de Petri em ensaio de produção de compostos voláteis em placas sobrepostas. Médias seguidas de mesma não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os traços representam o desvio padrão.

### ARTIGO 3

## PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO DE FEIJOEIRO E SUA EFICIENCIA NO CONTROLE CONTRA PATÓGENOS DA CULTURA EM CAMPO.

### RESUMO

Os isolados UFV-75, UFV-172 (*Bacillus cereus*) e UFV-108 (*Pseudomonas putida*), previamente selecionados entre os melhores agentes de biocontrole de doenças do feijoeiro em casa de vegetação, tiveram sua eficácia verificada em experimentos de campo contra doenças que ocorreram naturalmente na cultura. Sementes de feijoeiro foram plantadas e, dois dias após a emergência, as pulverizações foram iniciadas. No primeiro experimento, com cultivar 'Pérola', os tratamentos foram: a) agentes de biocontrole ( $OD_{540nm}=0,4$ ), pulverizados apenas uma vez; b) agentes de biocontrole pulverizados semanalmente ( $OD_{540nm}=0,4$ ); c) pulverização semanal com o fungicida clorotalonil; d) testemunha sem aplicação de agentes de biocontrole ou fungicidas. No segundo experimento, utilizou-se a cultivar 'Diamante Negro' e no terceiro, novamente a cultivar 'Pérola'. Nesses experimentos, os isolados foram pulverizados semanalmente apenas. No experimento 2 o fungicida utilizado foi o clorotalonil e no experimento 3 o oxiclureto de cobre. No primeiro experimento, a mancha angular ocorreu naturalmente, enquanto no segundo, ocorreram a mancha angular e a ferrugem e no terceiro ocorreu apenas ferrugem. As doenças foram avaliadas, usando escalas diagramáticas e, ao final do ciclo da cultura, a produção foi avaliada, pela colheita de sementes em todos os experimentos. Todos os isolados testados foram capazes de reduzir a severidade das doenças com incremento na produtividade em todos os tratamentos.

### ABSTRACT

In this work, isolates UFV-75 and UFV-172 (*Bacillus cereus*) and UFV-108 (*Pseudomonas putida*), all of them previously selected as good biocontrol agents for bean diseases under controlled conditions of a greenhouse, had their

effectiveness verified in field experiments where diseases occurred spontaneously. Bean seeds were sown in the field and, two days after emergency, spray programs started. In a first experiment, using the cultivar 'Pérola', treatments consisted in spraying: a) Biocontrol agents ( $OD_{540nm} = 0,4$ ), only once; b) biocontrol agents, weekly ( $OD_{540} = 0,4m$ ); c) Chlorothalonyl; d) No spray. A second experiment was set, by using cultivar 'Diamante Negro' and a third also, by using 'Pérola' cultivar, being the antagonists delivered to plants by weekly sprayings. In experiment 2 the fungicide adopted was Chlorothalonyl and in the experiment 3 was the copper oxchloride. In the first experiment, only angular leaf spot occurred spontaneously while in the second both angular leaf spot and bean rust happened and in the third only rust appeared. Disease severity was weekly evaluated by using diagrammatic scales and, at the end of the culture cycle, seed production was estimated for every treatment. All biocontrol agents under investigation did reduce disease severity in all with increases in productivity in all treatments.

## INTRODUÇÃO

O feijoeiro é uma das principais culturas plantadas no país, constituindo numa das bases de alimentação do povo brasileiro. Seu plantio encontra-se distribuído nas mais diversas regiões onde são empregados diferentes níveis tecnológicos (Araújo *et al.*, 1996).

Embora o País seja o maior produtor mundial, com produção da ordem de três milhões de toneladas, numa área de aproximadamente 4,3 milhões de hectares (Yokoyama, 2002), alguns fatores têm impedido a expansão da produtividade da cultura. Certamente, a ocorrência de doenças tem papel fundamental nesse processo.

Mais de duzentos patógenos ocorrem nas plantas durante o seu ciclo de vida ao redor do mundo. Entretanto, apenas uma dúzia delas causa perdas econômicas (Hall, 1994; Sartorato & Rava, 1994).

No feijoeiro comum, a mancha angular (causada por *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr.) e a ferrugem (causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger) são as doenças foliares mais destrutivas no Brasil. As perdas

provocadas por esses patógenos no país variam entre 1 e 70% para a mancha angular e até 68 % para a ferrugem (Zambolim & Chaves, 1978; Sartorato & Rava, 1994; Vale & Zambolim, 1997 ).

O controle dessas doenças basea-se no uso de cultivares resistentes (Vale & Zambolim, 1997). Entretanto, a maioria dos genótipos testados tem se mostrado suscetível e, mesmo as linhagens resistentes têm apresentado sérios problemas quando levadas a campo, devido a grande variabilidade dos patógenos (Sartorato, 2002).

Apesar de o controle químico ser considerado um método de controle eficaz, com bons ganhos na produtividade, este tem sido evitado, em parte pelo uso de cultivares tidas como resistentes, em parte também pelo baixo nível tecnológico de muitos pequenos e médios produtores e em parte pelo aumento nos custos de produção, não compensado pelos preços alcançados pelo produto (Rodrigues & Vieira, 2002; Kyiuna & Assumpção, 2002). Por isso, medidas complementares ao uso do controle químico e variedades resistentes têm sido propostas, dentro de um contexto de manejo integrado em que se visa a maior produtividade e redução dos custos de produção. Entre elas, o controle biológico, tem ganhado destaque, nas últimas duas décadas (Nordlund, 1996; Buchenauer, 1998; Romeiro *et al.*, 2000; Zambolim, 2001; Mader *et al.*, 2002; Bettiol & Ghini, 2003).

Quando se trata do controle biológico em campo, existe certo ceticismo quanto a eficiência nestas condições pois em alguns casos, os isolados não apresentam no campo o mesmo desempenho no controle de doenças que o obtido nos ensaios em casa de vegetação, principalmente quando se trata do uso de microrganismos para o controle de doenças no filoplano (Sleesman & Leben, 1976; Mariano, 1993; Bettiol, 1997). Por outro lado, existem diversos exemplos de microrganismos que controlaram com êxito patógenos em diferentes culturas, em condições de campo, quando aplicados na folhas (Korsten *et al.*, 1997; Masangkay *et al.*, 1999; Zhang & Yuen, 1999; Kazmar *et al.*, 2000).

Na cultura do feijoeiro, alguns trabalhos foram desenvolvidos visando ao controle biológico de alguns patógenos específicos, como da ferrugem (Baker *et al.* 1983; Mizubuti *et al.*, 1995; Yuen *et al.*, 2001) e do crestamento bacteriano comum (Silva *et al.*, 2004; Zanata & Moura, 2004).

Em ensaios em casa de vegetação, Vieira Júnior e colaboradores partindo de 500 isolados de procariotas residentes de filoplano, obtidos de folhas de feijoeiros sadios cultivar 'Pérola', selecionaram três isolados mais eficientes em controlar a mancha angular e o crestamento bacteriano comum. (Vieira Júnior *et al.*, 2004a; Vieira Júnior I *et al.*, 2004b). Estes isolados foram: UFV-75 e UFV-172 (identificados por sequenciamento do RNA16S como *Bacillus cereus*) e UFV-108 (identificado por análise de ácidos graxos como *Pseudomonas putida*).

No processo de seleção massal, para obter microrganismos para controle biológico, os experimentos de campo constituem-se em uma das principais etapas deste processo. Ademais, torna-se necessário o estudo mais aprofundado deste controle, repetindo-se o experimento no tempo e no espaço, com cultivares diferentes e com doenças diferentes (Romeiro *et al.*, 2000).

Objetivou-se neste trabalho avaliar a eficácia de controle de doenças de parte aérea do feijoeiro pelos isolados UFV-75, UFV-108 e UFV172 em campo.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Manejo da cultura**

Os experimentos de campo foram realizados nos períodos entre 1º de fevereiro e 27 de maio 2004 (primeiro experimento) e entre 27 de outubro de 2004 e 4 de fevereiro de 2005 (segundo e terceiro experimentos), no Sítio Criciúma, localizado a 1,3 km do campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

A área utilizada foi preparada segundo as indicações contidas em Araújo *et al.*, (1996). Foi feita amostragem do solo da área e, com base nos resultados da análise a adubação foi feita, conforme recomendações contidas em Ribeiro *et al.* (1999). Aos 40 dias após a emergência realizou-se uma segunda adubação, de cobertura, com sulfato de amônio, nos três experimentos. No primeiro e terceiro experimentos utilizaram-se sementes da cultivar 'Pérola' e no segundo, da cultivar 'Diamante Negro'. Foram usadas 15 sementes de feijoeiro por metro, com espaçamento de 0,5 m entre linhas. Realizou-se o controle de plantas

daninhas com capinas regulares ao longo do ciclo da cultura, nos três experimentos.

### **Descrição dos experimentos.**

No primeiro experimento, os tratamentos foram: i) pulverização única de suspensão de células do isolado UFV-75; ii) pulverização única de suspensão de células do isolado UFV- 108; iii) pulverização única de suspensão de células do isolado UFV-172; iv) pulverização semanal de suspensão de células do isolado UFV-75; v) pulverização semanal de suspensão de células do isolado UFV-108; vi) pulverização semanal de suspensão de células do isolado UFV-172; vii) pulverização única de fungicida clorotalonil; viii) pulverização semanal do fungicida clorotalonil e; ix) ausência de pulverização do fungicida ou dos isolados (testemunha).

No segundo e terceiro experimentos, os tratamentos foram: i) pulverização semanal de suspensão de células do isolado UFV-75; ii) pulverização semanal de suspensão de células do isolado UFV-108; iii) pulverização semanal de suspensão de células do isolado UFV-172; iv) pulverização semanal do fungicida clorotalonil (experimento 2) ou pulverização semanal do fungicida oxicloreto de cobre (experimento 3) e; v) ausência de pulverização de fungicida ou dos isolados (testemunha).

Para o preparo das suspensões dos antagonistas, células dos mesmos, obtidas de tubos de ensaio contendo meio 523 (Kado e Heskett, 1970), foram suspendidas em solução salina (NaCl) 0,85% esterilizada e semeadas por espalhamento, em placas de Petri contendo meio 523 e incubadas em incubadoras do tipo B.O.D., por 24 h, a 28°C. Suspensões de células dos isolados foram preparadas e ajustadas para absorbância a 540nm ( $A_{540}$ ) igual a 0,4. As pulverizações foram iniciadas dois dias após a emergência das plantas.

### **Avaliações**

Ao longo do ciclo da cultura avaliou-se a severidade das doenças que ocorreram naturalmente nas plantas. A severidade foi avaliada semanalmente, quantificando se a porcentagem de área foliar lesionada de toda a planta. Para tanto, utilizou-se as escalas diagramáticas propostas por Godoy *et al.* (1997).

Para a determinação a área abaixo da curva de progresso de doenças (AACPD), utilizou-se as fórmulas contidas em Madden (1983).

Avaliou-se também produtividade por planta, pela pesagem das sementes.

### **Delineamento experimental**

Os experimentos foram montados num delineamento de blocos ao acaso, com quatro repetições, avaliando-se 10 plantas por repetição.

### **Análise de dados**

A análise dos dados foi realizada através do programa Statistica®, versão 6.0 e o teste de média de Tukey, ao nível de significância de 5%.

## **RESULTADOS.**

### **Resultados Gerais**

Foi possível observar que os isolados atrasaram a ocorrência da doença e também influíram diretamente na taxa de progresso dos patógenos.

No primeiro experimento, ocorreu antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) nas bordaduras de alguns tratamentos do bloco quatro. O mesmo foi observado no experimento dois, no bloco um, nos tratamentos com UFV-75 e com fungicida.

Na colheita do experimento 3, foi observada a ocorrência de podridão do colo (*Sclerotium rolfsii*) em plantas já secas, nos tratamentos UFV-172 e numa das bordaduras.

### **Experimento 1**

*Phaeoisariopsis griseola*, causador da mancha angular, ocorreu naturalmente em todas as parcelas. Embora tenha chovido pouco durante avaliação do experimento, a umidade esteve bastante elevada, na maior parte do tempo. Esta condição foi bastante favorável para a ocorrência da mancha angular.

Embora os isolados tenham tido efeito significativo sobre a redução da severidade da mancha angular, em todos os casos, a aplicação semanal dos mesmos superou os tratamentos em que os isolados foram aplicados apenas uma vez. A exceção foi isolado UFV-172 que, quando aplicado uma única vez, pôde ser comparado em eficiência aos níveis de controle obtidos pelos isolados aplicados semanalmente (Figura 1). Em comparação a testemunha, os isolados

UFV-75, Ufv-172 e Ufv-108, quando aplicados semanalmente, atrasaram o início da doença e a afetaram o progresso da mesma, o que resultou numa quantidade de doença menor (Figura 2).

Com a redução da severidade da doença, houve um ganho de produtividade significativo, embora pequeno, nos tratamentos onde houve aplicação dos isolados, tanto semanalmente, quanto apenas uma vez, em comparação com a testemunha (Figura 3).

### **Experimento 2**

A ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* e a mancha angular, ocorreram concomitantemente em todas as parcelas avaliadas. A condição ambiental foi bastante favorável à ocorrência das epidemias, com alta umidade na maior parte do tempo e chuvas em alguns períodos em que o experimento foi avaliado.

Os isolados aplicados semanalmente foram eficientes em reduzir a severidade da mancha angular e da ferrugem. O isolado Ufv-75 destacou-se, reduzindo a severidade da mancha angular em até 50% e a ferrugem em até 75% (Figuras 4 e 5). Os isolados Ufv-172 e Ufv-018 também foram eficientes, embora não tanto como o tratamento com fungicida Clorotalonil para controle da mancha angular. Estes foram capazes de reduzir a severidade da doença em até 57,1 e 19,9%. Nesse experimento, não foi possível realizar comparações entre os tratamentos com antagonistas e o controle químico, na eficiência de controle da ferrugem, já que o fungicida adotado não é específico para o controle da doença. (Figura 6 e 7).

Com a redução da severidade, houve significativo aumento na produtividade, quando comparados os tratamentos com antagonistas e a testemunha (Figura 8).

### **Experimento 3**

Neste experimento, só a ferrugem ocorreu em todas as parcelas avaliadas. As condições ambientais foram as mesmas do experimento dois.

Novamente, houve efeito dos isolados no controle na ferrugem, em especial do isolado Ufv-75, que foi capaz de reduzir a severidade da doença quando comparado à testemunha com eficiência de controle superior a do tratamento com oxiclureto de cobre.

Os isolados UFV-172 e UFV-108 também reduziram a severidade da ferrugem, embora com eficiência inferior a do tratamento com o fungicida oxicloreto de cobre (Figuras 9 e 10).

Houve aumento na produtividade em todos os tratamentos, em comparação com a testemunha. Este aumento está relacionado com a proteção exercida pelos isolados e pelo fungicida. Entre todos os tratamentos, o isolado UFV-75, proporcionou maior produtividade por planta (Figura 11).

## DISCUSSÃO

Embora alguns autores requeiram o uso do controle biológico a um plano secundário, para ser usado em situações específicas, fruto da sua menor eficácia, quando comparado com os métodos tradicionais de controle (Windels & Lindow, 1985; Mariano, 1993; Pabitra *et al.*, 1996; Bettiol, 1997; Zang & Yuen, 1999), nestes experimentos, ficou demonstrado que seus efeitos podem ser bastante benéficos no que tange ao controle de doenças foliares do feijoeiro em campo.

O questionamento sobre a eficácia de controle em campo, tem sido feito por diversos autores, que alegam que a seleção feita *in vitro* ou mesmo *in vivo* em casa de vegetação não representa a realidade, uma vez que, o crescimento em meio de cultura aumenta a concentração de compostos tóxicos produzidos pelos microrganismos e isso, poderia não ser expresso *in vivo* (Mariano, 1993; Bettiol, 1997). Ademais, em ambiente protegido da casa de vegetação, os efeitos da radiação UV, ventos, chuva, emigração e imigração de microrganismos da filosfera, sobre os microrganismos selecionados como agentes de biocontrole seriam reduzidos, e esses fatores estão entre os que mais interferem na sobrevivência do potencial antagonista (Bettiol, 1997; Hirano e Upper, 2000; Lindow & Brandl, 2003). Para o objetivo deste trabalho, a seleção massal *in vivo*, feita em casa de vegetação, parece ter sido uma opção correta, em vista dos resultados obtidos em campo. Nos três experimentos de campo, os três isolados selecionados na seleção massal mostraram-se promissores como agentes de biocontrole.

Desses, o isolado UFV-75 tem o maior potencial para se tornar um produto comercial, em vista dos níveis de controle obtidos em épocas diferentes e contra patógenos altamente destrutivos, os quais possuem mecanismos de patogenicidade totalmente distintos. Some-se a isso, os efeitos benéficos indiretos do microrganismo na produtividade, em ambas as cultivares.

O efeito do controle das doenças na produtividade, embora tenha variado de isolado para isolado e entre as cultivares testadas, foi visível nos três experimentos, embora Bergamim Filho *et al.* (1997) afirmem que essa correlação não seja tão facilmente observável. Segundo os autores essa correlação depende dos níveis de desfolha provocados pelos patógenos, que precisam ser elevados e a condição climática seja favorável. Segundo Jesus-Júnior (2001) essa desfolha ocorre quando a condição climática é favorável à ocorrência do patógeno e, se mais de um patógeno ocorre ao longo do ciclo da cultura. Essas informações corroboram o que foi observado em todos os experimentos, já que a condição para a ocorrência das doenças nos três experimentos foi bastante favorável e o nível das epidemias foi elevado.

Isso foi observado no experimento 2, quando o isolados marcadamente reduziram a severidade de uma infecção mista dos dois patógenos, em condições favoráveis para ambos, pois o período em questão é chuvoso e com temperaturas variando de quente à amenas, condição *sine qua non* para a ocorrência de epidemias dessas duas doenças (Hall, 1994; Sartorato & Rava, 1994). Com a condição de infecção mista de patógenos e ambiente favorável aos danos os isolados tiveram sua ação antagônica maximizada, tornando o efeito de controle das doenças sobre a produtividade expressiva.

Os isolados atrasaram o ciclo das doenças e também a taxa de crescimento da epidemia, quando comparados com a testemunha. Pode-se conjecturar que os antagonistas reduziram o crescimento micelial e a germinação dos esporos dos fungos, como observado *in vitro* (artigo 2). Os mecanismos envolvidos nesse controle são: produção de sideróforos, produção de enzimas quitinolíticas, etc.

A exceção a essa regra é o isolado UFV-172, que *in vitro* não apresentou nenhum efeito direto sobre os patógenos (artigo 2), mas na seleção massal em

casa de vegetação proporcionou excelentes resultados de controle dos patógenos (artigo 1), o mesmo ocorrendo nos experimentos de campo.

Postula-se que o efeito de UFV-172 sobre os patógenos seja indireto. O isolado estaria atuando na indução de resistência sistêmica das plantas de feijoeiro contra os patógenos, conforme descrito por Steiner e Schönbeck (1995). Embora o isolado não atue diretamente sobre os patógenos ele pode induzir a síntese de enzimas envolvidas na ativação do estado de indução ou, produzindo algum composto que atue na planta como sinalizador de indução para desencadeamento do fenômeno de indução (Romeiro, 1999). Vieira Júnior *et al.*, (2005) demonstraram que esse fenômeno, primordialmente descrito ocorrendo com rizobactérias, também se dava com residentes de filoplano, quando plantas de tomateiro eram expostas a um isolado putativamente indutor separado espacialmente do patógeno e, em seguida, eram desafiadas com o patógeno foliar *Pseudomonas syringae pv. tomato*. Estudos para confirmação da indução de resistência em plantas feijoeiro por UFV-172 são apresentados nos artigos 7 e 8.

É importante ressaltar ainda que, os isolados foram aplicados por meio de formulações de células nuas e, sabidamente, esta não é a condição ideal em que se devam aplicar antagonistas microbianos no filoplano. É necessário o desenvolvimento de formulações que aumentem a taxa de viabilidade de células dos antagonistas na superfície das folhas, via aumento da quantidade de nutrientes ou da proteção dos isolados contra os efeitos dos fatores ambientais como radiação UV, dessecação pela ação dos ventos, etc. Também é necessário estudo aprofundado de formas de aplicação, tipo de formulação (líquida ou em pó), número de aplicações necessárias para se manter as doenças abaixo do nível de dano econômico, testes de toxicidade crônica e aguda para aves, peixes, insetos, algas e mamíferos, bem como os custos de cada aplicação. Os resultados desses estudos serão fundamentais para a determinação da viabilidade de produção e comercialização de uma formulação comercial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & ZIMMERMANN, M. J.O. (ed.) **Cultura do Feijoeiro no Brasil**, Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1996, 786p.
- BAKER, C. J.; STAVELY, J.R. & MOCK, N. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. **Plant Disease**, v. 69, n. 4, p. 770-772, 1985.
- BERGAMIN FILHO, A., CARNEIRO, S. M. T. P. G., GODOY, C. V., AMORIM, L., BERGER, R. D. & HAU, B. 1997. Angular leaf spot of *Phaseolus* beans: Relationships between disease, healthy leaf area, and yield. **Phytopathology**, v.87, n.5, p.506-515, 1997.
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 79-96, 2003.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease Protection**, v. 105, n. 4, p.329-348, 1998.
- GODOY, C. V.; CARNEIRO, S. M.T. P. G.; IAMUTI, M. T.; PRIA, M.D.; AMORIM, L.; BERGER, R. D. & BERGAMIM FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.104, n.4, p.336-345, 1997.
- HALL, R. (Ed.). **Compendium of Bean Diseases**, St. Paul, APS Press, 1991. 73p.
- HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 624-653, 2000.
- JESUS-JÚNIOR, W.C. **Effects of angular leaf spot and rust on plant growth and yield of *Phaseolus vulgaris***. Viçosa, UFV: Depto. de Fitopatologia, 2001. 96p. (Tese de Doutorado).
- KAZMAR, E. R.; GOODMAN, R. M.; GRAU, C. R.; JOHNSON, D. W.; NORDHEIM, E. V.; UNDERSANDER, DANIEL J. & HANDELSMAN, J. Regression analyses for evaluating the influence of *Bacillus cereus* on alfalfa yield under variable disease intensity. **Phytopathology**, v.90, n.6, p.657-665, 2000.
- KIYUNA, I. & ASSUMPÇÃO, R. EL NIÑO- oscilação sul e o mercado de feijão no Brasil. In: VIEIRA, C. (Org.) **VII CONAFE- Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão**, 8 a 12 de setembro de 2002, Viçosa, UFV; Depto. de Fitotecnia. p.650-653, 2002.

- KORSTEN, L.; DE VILLIERS, E. E.; WEHNER, F. C. & KOTZE, J. M. Field Sprays of *Bacillus subtilis* and Fungicides for Control of Preharvest Fruit Diseases of Avocado in South Africa. **Plant Disease**, v. 81, n. 4, p 455-459, 1997.
- LINDOW, S. E. & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.4, p. 1875-1883, 2003.
- MADDEN, L. V. Measuring and modeling losses at the field level. **Phytopathology**, v.73, n.11, p.1591-1596.
- MASANGKAY, R. F., PAULITZ, T. C., HALLETT, S. G., AND WATSON, A. K. Factors influencing biological control of *Sphenoclea zeylanica* with *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. **Plant Disease**, v. 83, n 10, p.1019-1024, 1999.
- MIZUBUTI, E. S.G; MAFFIA, L.A.; MUCHOVEJ, J. J.; ROMEIRO, R.S. & BATISTA, U.G. Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. **Fitopatologia Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 540-544, 1995.
- NORDLUND, D. A. Biological control, integrated pest management and conceptual models. **Biocontrol News and information**, v. 17, n. 2, p.35-44, 1996.
- MADER, P.; FLIEBACK, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P. & NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, n.5573, p. 1694-1697, 2002.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.1, p369-409, 1993.
- RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G. & ALVAREZ V, V. H. (ed.) **Recomendações para uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais- 5ª. aproximação**, Viçosa, CFSEMG, 1999, 359p.
- RODRIGUES, O. L. & VIEIRA, R. F. Ganhos em produtividade com o uso de fungicidas em cultivares/linhagens de feijão com diferentes reações a doenças. In: VIEIRA, C. (Org.) **VII CONAFE- Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão**, 8 a 12 de setembro de 2002, Viçosa, UFV; Depto. de Fitotecnia. p. 172- 175, 2002.
- ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência em Plantas a Patógenos**, Viçosa, Editora UFV, 1999, 45p.
- ROMEIRO, R.S.; NEVES, D. M. S. CARVALHO, M. G. & CARRER-FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 220-224, 2000.

- SARTORATO, A.& RAVA, C. A. **Principais doenças e pragas do feijão comum e o seu controle** (ed.) Goiânia; EMBRAPA-CNPFA, 1994, 290p.
- SARTORATO, A. Resistência do feijoeiro-comum à mancha angular. In: VIEIRA, C. (Org.) **VII CONAFE-Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão**, 8 a 12 de setembro de 2002, Viçosa, UFV; Depto. de Fitotecnia. p. 117-119, 2002.
- SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C. & FARIAS, D. R. Atividade antimicrobiana in vitro e efeito de doses do isolado bacteriano DFs842, em casa de vegetação, no biocontrole do cretamento bacteriano comum do feijão. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, suplemento, p. 144. 2004. (Resumo).
- SLEESMAN, J. P. & LEBEN, C. Microbial antagonists of *Bipolaris maydis* **Phytopathology**, v.19, n.10, p.1214-1218, 1976.
- STEINER, U & SCHONBECK, F. Induced resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT & KUC, J. (Ed). **Induced Resistance to Disease in Plants- Developments in Plant Pathology**, v.4, Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, 1995.
- VALE, F. X. R. & ZAMBOLIM, L. (Ed.), **Controle de Doenças de Plantas : grandes culturas**, Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia, vol. 1, 1997, 554p.
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, G. S.; LANNA FILHO, R. & MENDONÇA, H. L. Residentes de filoplano bacterianos como agentes de biocontrole do cretamento bacteriano comum do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 76, 2004a (Resumo).
- VIEIRA JÚNIOR, J. R.; ROMEIRO, R. S.; BATISTA, G. S. & LANNA FILHO. Procariotas residentes de filoplano como agentes de biocontrole da mancha angular do feijoeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 76, 2004b (Resumo).
- VIEIRA-JÚNIOR, J.R. HALFELD-VIEIRA, B.A; ROMEIRO, R.S. & NEVES, D. M. S. Procariotas residentes de filoplano como indutores de resistência sistêmica à doenças em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.31, supl. P175-176, 2005 (Resumo)
- YOKOYAMA, L. P. O feijão no Brasil no período de 1984/85 a 1999/00: Aspectos conjunturais. In: VIEIRA, C. (Org.) **VII CONAFE- Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão**, 8 a 12 de setembro de 2002, Viçosa, UFV; Depto. de Fitotecnia. p. 654-657, 2002.
- YUEN, G.Y.; STEADMAN, J.R.; LINDGREN, D.T.; SCHA, D. & JOCHUM, C. Bean rust biological control using bacterial agents. **Crop Protection**, n. 20, p. 395-402, 2001.

ZAMBOLIM, L.& CHAVES, G.M. **Doenças do feijoeiro e seu controle**  
**Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.4, p.50-63, 1978.

ZAMBOLIM, L. (ed.). **Manejo Integrado-Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**, Viçosa, Depto. de Fitopatologia, 2001.722p

ZANATTA, Z. G. C. N.; MOURA, A. B. Avaliação de bactérias biocontroladoras de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* na cultura do feijão em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, supl., p. 170, 2004. (Resumo).

ZHANG, Z. & YUEN, G. Y. Biological control of *Bipolaris sorokiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. **Phytopathology**, v.89, n.9, p. 817-822, 1999.

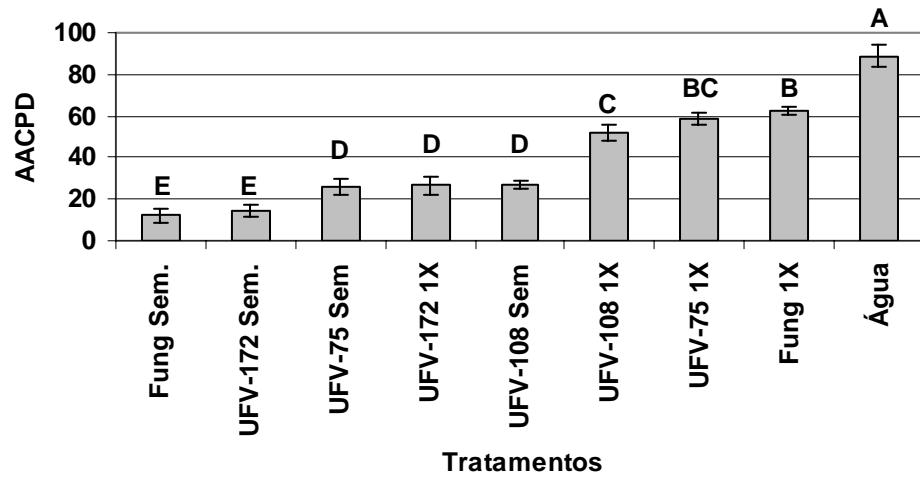


Figura1-Área Abaixo da Curva de Progresso da mancha angular (AACPD) nos tratamentos com os isolados de procariontes residentes de filoplano pulverizados semanalmente (Sem.) ou apenas uma vez (1X). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

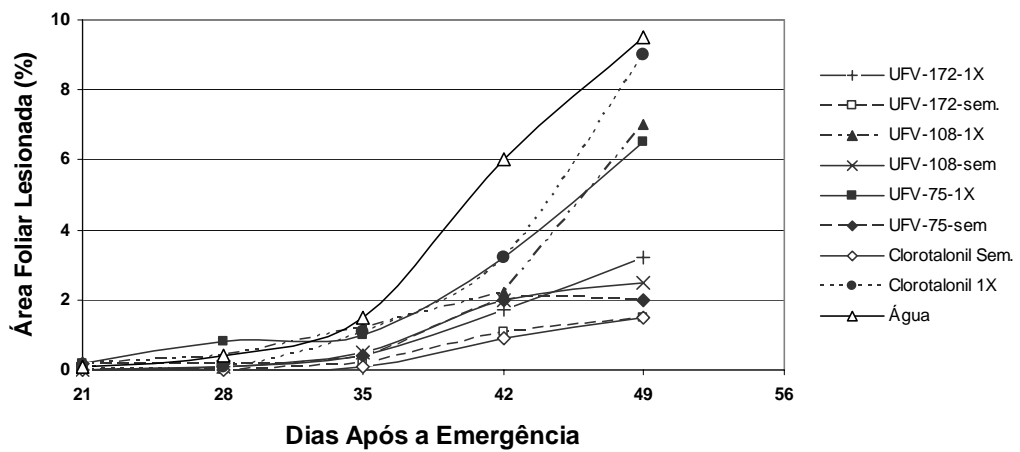


Figura 2-Curva de progresso da mancha angular em plantas de feijoeiro cultivar Pérola pulverizadas semanalmente (Sem.) ou apenas uma vez (1X) com isolados de procariontes residentes de filoplano.

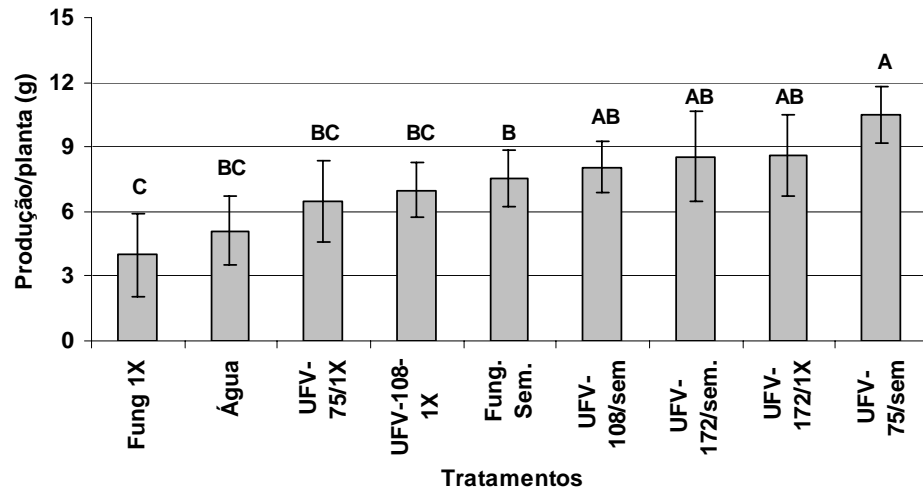


Figura 3-Produtividade de plantas de feijoeiro cultivar Pérola em plantas pulverizadas semanalmente (Sem.) ou apenas uma vez (1X) com isolados de procariotas residentes de filoplano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

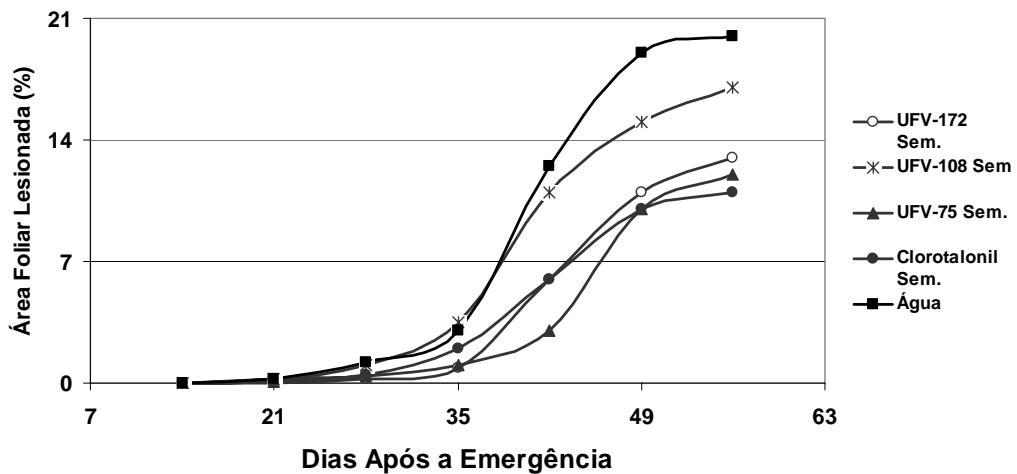


Figura 4-Curva de progresso da mancha angular em plantas de feijoeiro cultivar Diamante Negro pulverizadas semanalmente (Sem.) com isolados de procariotas residentes de filoplano.

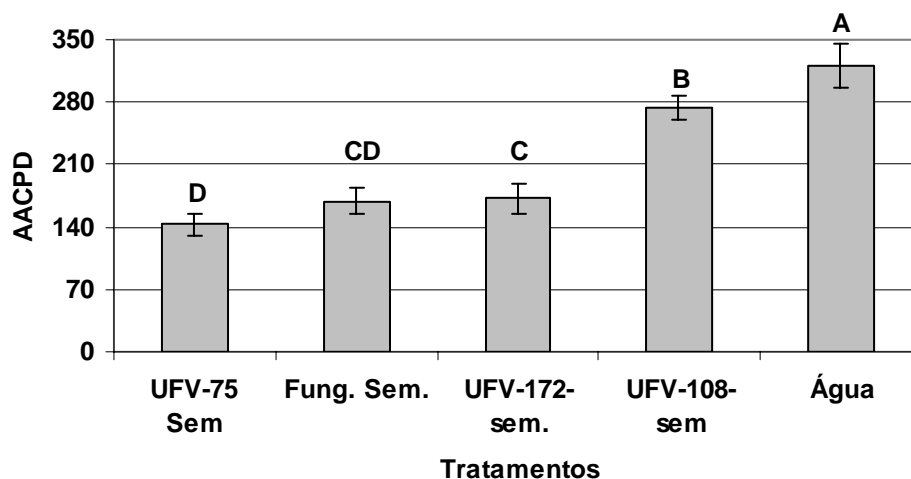


Figura 5 - Área Abaixo da Curva de Progresso da Mancha (AACPD) em plantas de feijoeiro cultivar Diamante Negro nos tratamentos com isolados de procariontes residentes de filoplano pulverizados semanalmente (Sem.). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

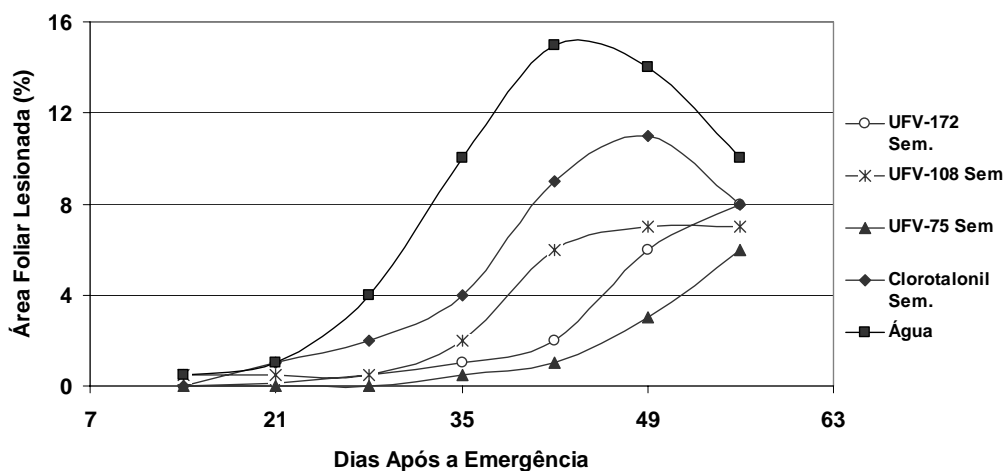


Figura 6 - Curva de progresso da ferrugem em plantas de feijoeiro cultivar Diamante Negro pulverizadas semanalmente (Sem.) com isolados de procariontes residentes de filoplano.

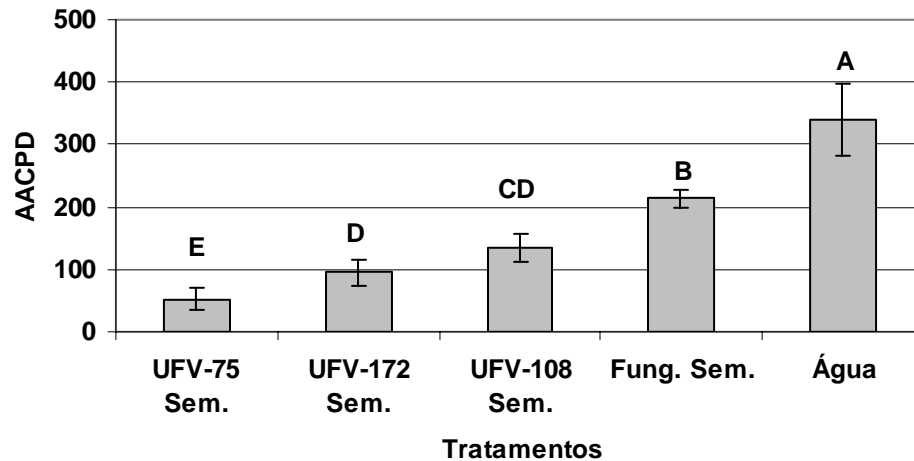


Figura 7 - Área Abaixo da Curva de Progresso da ferrugem (AACPD) em plantas de feijoeiro cultivar Diamante Negro nos tratamentos com isolados de procariotas residentes de filoplano pulverizados semanalmente (Sem.). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

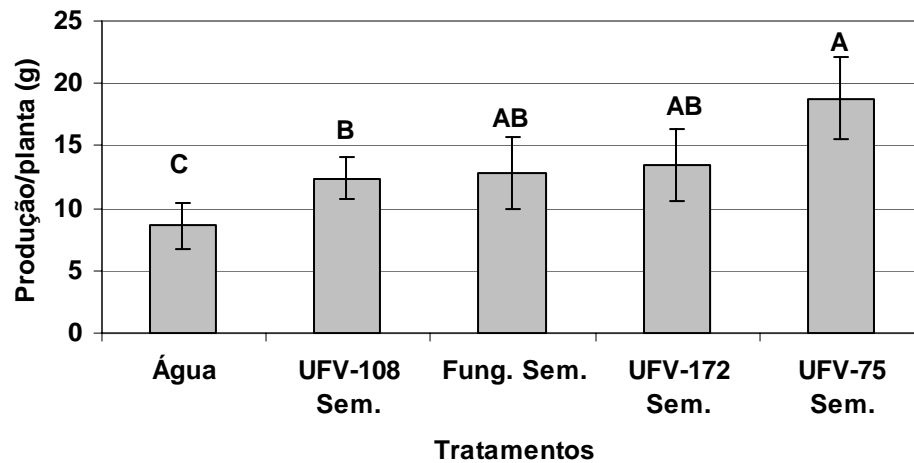


Figura 8 - Produtividade de plantas de feijoeiro cultivar Diamante Negro em plantas pulverizadas semanalmente (Sem.) com isolados de procariotas residentes de filoplano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

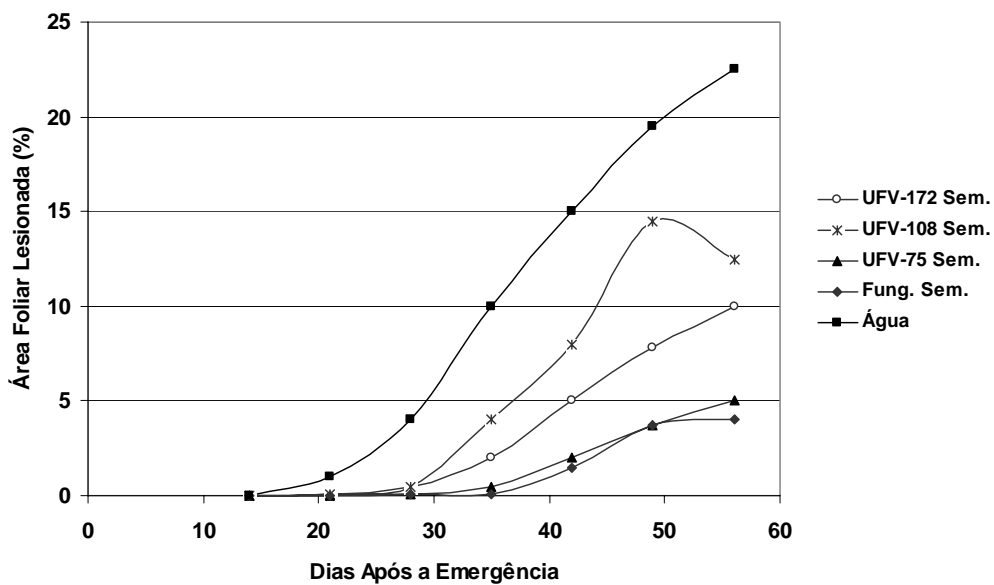


Figura 9 - Curva de progresso da ferrugem em plantas de feijoeiro cultivar Pérola pulverizadas semanalmente (Sem.) com isolados de procariotas residentes de filoplano.

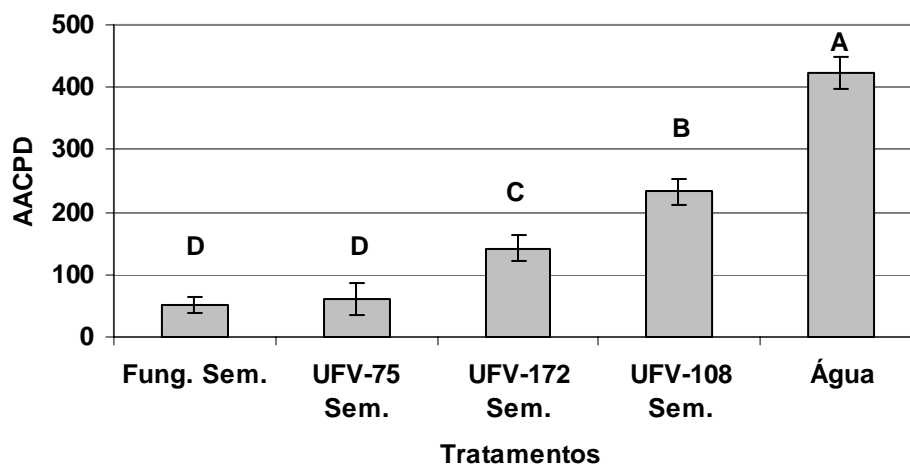


Figura 10 - Área Abaixo da Curva de Progresso da ferrugem (AACPD) em plantas de feijoeiro cultivar Diamante Negro nos tratamentos com isolados de procariotas residentes de filoplano pulverizados semanalmente (Sem.). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

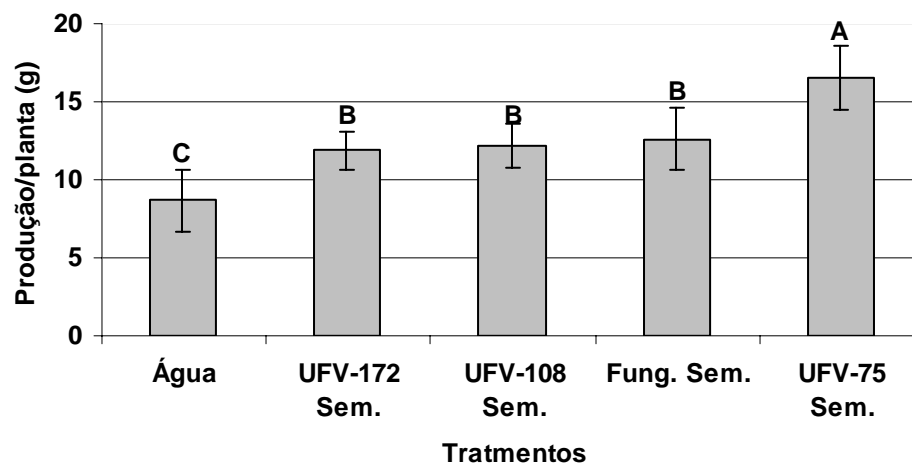


Figura 11 - Produtividade de plantas de feijoeiro cultivar Diamante Negro em plantas pulverizadas semanalmente (Sem.) com isolados de procariotas residentes de filoplano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

## ARTIGO 4

### PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM PLANTAS DE FEIJOEIRO POR UM ISOLADO PROCARIOTA RESIDENTE DE FILOPLANO

#### RESUMO

Tem sido relatado que bactérias que vivem na rizosfera são capazes de promover o crescimento de plantas (rizobactérias ou PGPR's) e que muitas destas bactérias que ocorrem associadas à raízes também ocorrem na superfície de folhas, colonizando o filoplano. Objetivou-se neste trabalho testar 500 isolados de procariotas residentes de filoplano obtidos de folhas de feijoeiro sadio, quanto a sua capacidade de promover o crescimento de plantas em casa de vegetação e campo. Para tanto, grupos de cinco plantas/isolado de feijoeiro da cultivar Pérola foram pulverizadas com suspensão de células ajustadas a uma densidade ótica de  $(OD_{540nm}) = 0,4$ . Aos 30 dias após a emergência, quantificou-se a altura de plantas e a área das folhas primárias. O isolado UFV-74 (identificado como *Pseudomonas putida*) foi selecionado como o mais promissor. Em campo, sementes de feijoeiro microbiolizadas ou não com UFV-74 foram plantadas e, aos 10 dias após a emergência, as plantas advindas de sementes não microbiolizadas foram pulverizadas com suspensão de células ajustadas a uma densidade ótica de  $(OD_{540nm}) = 0,4$ . Como testemunhas, utilizaram-se plantas não tratadas e sementes apenas embebidas em água. Avaliou-se o crescimento das plantas até os 45 dias após a emergência. Ao fim do ciclo da cultura, as plantas foram colhidas e pesadas. Quantificou-se o peso de sementes, o número de sementes por planta e a produtividade. Os resultados obtidos mostram que *P. putida* (UFV-74) foi eficiente em promover o crescimento das plantas e aumentou em 20,8 % a produtividade das mesmas, tanto em pulverização quanto em microbiolização das sementes, quando comparadas com os tratamentos controles. Muito embora esses resultados ainda sejam preliminares existem fortes indícios para acreditar que o fenômeno de promoção de crescimento de plantas esteja ocorrendo.

## ABSTRACT

It has been reported that bacteria which lives in the rhizosphere are able to promote plant growth (rhizobacteria or PGPR) and that quite a few of them occur both associated to roots and in leaf surfaces, as phylloplane colonizers. The ability of 500 bacteria isolated as bean phylloplane residents to promote growth of bean plants either in greenhouse or in the field was checked. Every isolate was delivered to a set of 5 plants by spraying a cell suspension ( $A_{540nm} = 0,4$ ) and, 30 days after germination, plant height (cm) as well as primary leaf areas ( $cm^2$ ) were estimated. Isolate UFV-74 (*Pseudomonas putida*) was the most efficient growth promoter out all 500 isolates tested under greenhouse condition. In a field experiment, bean seeds either regular ones or microbiolized with propagules of isolate UFV-74 were seeded and, 10 days after germination, plants arisen from non-microbiolized seeds were sprayed with a cell suspensions (UFV-74,  $OD_{540nm} = 0,4$ ), using non-sprayed and non-microbiolized plants as controls. Plant growth was evaluated until the forty fifth day after germination. At the end of the plant cycle, whole plants were pulled out and weighted. Moreover, seed weight, seeds per plant and total seed production was recorded. The result shows which *P. putida* (UFV-74) was efficient for promoting plant growth and increasing production in 20, 8 % either if delivered by seed microbiolization or by spraying. In spite of these results been preliminary, exists strong indication to believe which the plant growth promotion phenomenon is happen.

## INTRODUÇÃO

As plantas e os microrganismos constituem um sistema equilibrado e complexo, havendo na superfície das primeiras, interações com microrganismos epifíticos e destes entre si (Kloepper, 1993). Essas interações complexas são frutos da co-evolução. Ao longo das eras, plantas e microrganismos travam entre si e com o ambiente arraigada luta para garantir a sobrevivência de cada um, num equilíbrio que ora pende para a patogenicidade, ora para a resistência, ora para a simbiose, ora para a neutralidade (Agrios, 1997).

Entre os microrganismos capazes de colonizar a superfície das plantas, as bactérias pertencem ao grupo mais numeroso (Beattie & Lindow 1999). Lindow & Leveau (2002) afirmam que na superfície das folhas é possível encontrar mais que  $10^7$  células bacterianas por centímetro quadrado, embora apenas uma pequena parcela destas tenha potencial para afetar negativa ou positivamente a produtividade das plantas.

Muito pouco se sabe, à luz do conhecimento atual, sobre as interações positivas entre bactérias e as plantas que podem ocorrer na superfície das folhas (Kinkle, 1997; Hirano & Upper, 2000). O pouco que se sabe, relaciona-se com a potencialidade de uso de microrganismos como agentes de controle biológico de doenças (Windels & Lindow, 1985; Andrews, 1992; Bettiol, 1997; Elad *et al.*, 1999).

O conhecimento adquirido quanto à interação de microrganismos com o sistema radicular das plantas, no entanto, é grande. As bactérias capazes de colonizar o sistema radicular das plantas e sobreviver saprofiticamente nessa superfície são denominadas, segundo Kloepper & Schroth (1981), de rizobactérias ou PGPR's (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria). Essas bactérias vêm sendo estudadas nas últimas duas décadas, tanto para o incremento da produtividade agrícola, quanto como agentes de biocontrole de doenças de plantas (Beauchamp, 1993; Chen *et al.*, 1996; Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

Vários são os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento das plantas por PGPR's. Estes podem ser divididos em diretos, quando as bactérias produzem um composto ou metabólico que estimula o desenvolvimento da planta, ou favorece à aquisição de nutrientes no solo; ou indiretos; quando elas produzem substâncias antimicrobianas, competem por espaço, nutrientes e nichos ecológicos com outros microrganismos que podem ou não ser patogênicos à planta. São mecanismos diretos: a produção de fitormônios e a solubilização e disponibilização de nutrientes (Glick & Bashan, 1997; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

Um exemplo de microrganismo capaz de produzir fitormônios trata-se de espécies de *Azospirillum*, que além de ser uma bactéria fixadora de nitrogênio, também é capaz de produzir e secretar auxinas, citocininas e

giberelinas (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Algumas espécies de *Pseudomonas* e de *Bacillus* tem sido relatadas como capazes de produzir fitormônios, principalmente em plantas sob condição de estresse (Wilson, *et al.*, 1999; Lindow & Brandl, 2003).

Não obstante, algumas espécies de bactérias capazes de colonizar a superfície de raízes, também têm sido relatadas colonizando a superfície de folhas. Entre elas estão espécies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Serratia*, *Streptomyces*, etc (Kinkle, 1997; Hirano & Upper, 2000; Lindow & Leveau, 2002; Halfeld-Vieira *et al.*, 2004; Monier & Lindow, 2004). Algumas dessas bactérias inclusive são relatadas atuando agentes de biocontrole tanto no solo quanto em parte aérea (Braun-Kiewnick *et al.*, 1999; Gyenis, 2003; Korsten *et al.*, 1997; Kurze *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004). Porém, não existem até o presente, relatos comprovados de que, bactérias crescendo saprofiticamente na superfície de folhas, atuem como promotoras do crescimento de plantas.

Neste trabalho, objetivou-se verificar se isolados de procariotas residentes de filoplano, previamente selecionados como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea de feijoeiro, poderiam estar atuando como bactérias promotoras de crescimento de plantas, quando aplicadas nas folhas e nas raízes de plantas de feijoeiro, em casa de vegetação e campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Microrganismos, sua origem e seu cultivo.**

Quinhentos isolados bacterianos foram obtidos do filoplano de feijoeiros com idades variando entre 25 e 45 dias após a emergência, através do método de “imprinting” das folhas (Leben, 1961) na superfície do meio 523 (Kado & Heskett, 1970). Os isolados foram preservados por liofilização, em óleo mineral estéril, em água mineral estéril e, mantidos em geladeira conforme procedimentos descritos em Romeiro (2001).

### **Ensaio de promoção de crescimento em casa de vegetação**

Sementes de feijoeiro cultivar Pérola foram plantadas individualmente, em copos plásticos de 300 mL com solo pobre (2:2:0,5; areia:argila:esterco). Aos 10 dias após a emergência, as plantas tiveram as folhas primárias

pulverizadas com suspensão de células de cada isolado, ajustada à densidade óptica de 0,4 ( $OD_{540nm}$ ). As plantas pulverizadas foram distribuídas aleatoriamente sobre a bancada em casa de vegetação. Aos 30 dias após a emergência, mediu-se a área ( $cm^2$ ) das folhas primárias em medidor de área foliar (LI-COR; Modelo 3100), bem como, mediu-se a altura das plantas.

O delineamento experimental utilizado foi ao acaso, com cinco repetições por tratamento.

### **Ensaio de promoção de crescimento em condições de campo**

Com base nos resultados obtidos em casa de vegetação, selecionou-se o isolado que apresentou resultados mais satisfatórios para ser testado em campo.

O experimento foi dividido em quatro blocos, cada qual contendo os seguintes tratamentos: (a) sementes microbiolizadas com suspensão de células e não pulverizadas com suspensão de células; (b) sementes microbiolizadas e plantas pulverizadas semanalmente com suspensão de células; (c) sementes embebidas em água e plantas pulverizadas com suspensão de células; (d) sementes embebidas em água e plantas não pulverizadas.

Para microbiolização das sementes, preparou-se uma suspensão de células do isolado ajustada para a densidade óptica de 0,4 ( $OD_{540nm}$ ) pela adição de água filtrada não estéril nos tubos de ensaio com a cultura bacteriana com 24 horas de crescimento em meio 523 (Kado & Heskett, 1970). As sementes foram imersas em suspensão bacteriana, à temperatura ambiente, por 12 horas, sendo em seguida plantadas (Romeiro, 2000; Silva *et al.*, 2000).

Nos tratamentos em que se pulverizou o isolado nas folhas, a suspensão foi obtida de cultivo do isolado em meio 523 sólido por 24h em tubo inclinado, ao qual se adicionou água filtrada não estéril. A suspensão de células foi centrifugada a 10.000G, por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células re-suspendidas em água filtrada não estéril. O procedimento foi repetido por três vezes e então a suspensão foi ajustada à densidade óptica de 0,4 ( $OD_{540nm}$ ). A centrifugação teve por objetivo remover resíduos de meio de cultura que pudessem estar junto com as células do isolado, a fim de evitar que componentes do meio que tem ação indutora de resistência pudessem afetar o resultado.

Foram usadas 15 sementes por metro linear, com espaçamento entre linhas de 0,5 m, de acordo com as recomendações de espaçamento e densidade de plantio descritas em Araújo *et al.*, (1996). O delimitamento experimental foi de blocos ao acaso, com 4 repetições e cinco plantas por repetição.

Avaliou-se a germinação das sementes microbiolizadas com UFV-74 em comparação com as não-tratadas. As pulverizações semanais com suspensão de células do isolado nos tratamentos b e c iniciaram aos 10 dias após a emergência das plantas e foram encerradas quando as plantas atingiram os 40 dias após a emergência.

Semanalmente, avaliou-se o tamanho das plantas até os 45 dias após a emergência. A partir dos dados obtidos em campo determinou-se a área abaixo da curva de progresso de crescimento das plantas, por meio das equações descritas em Madden (1983).

Ao final do ciclo da cultura, avaliou-se o número de vagens por planta, o número de sementes por vagem, o número de sementes por planta, o peso das sementes e a produtividade por planta. Foram utilizadas cinco plantas no centro de cada parcela, para realizar as avaliações, deixando-se nas extremidades da linha cinco plantas.

Foi determinado também, o peso seco das plantas. Para tanto, foram colhidas três plantas de feijoeiro ao acaso por tratamento e por bloco, com sistema radicular e parte aérea, as quais foram secas por 72 h a 55° C em estufa aerada de secagem, antes da sua pesagem.

#### **Análise de dados**

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do programa Statistica®, versão 6.0. Para a comparação das médias empregou-se o teste de Tukey a 5% de significância.

## **RESULTADOS**

#### **Ensaio de promoção de crescimento em casa de vegetação.**

Dos 250 isolados testados, 15 promoveram o aumento da área foliar do feijoeiro. Os isolados UFV-74, UFV-178, UFV-121 e UFV-40 apresentaram os

melhores resultados, promovendo um aumento da área foliar em até 90% em relação à testemunha (Figura 1).

Quanto a altura das plantas, apenas o isolado UFV-74 diferiu significativamente da testemunha (Figura 2).

### **Ensaio de promoção de crescimento em condições de campo**

Não houve efeito significativo do isolado UFV-74 sobre o número sementes por vagem, quando aplicado via sementes microbiolizadas, via pulverização ou, via aplicação de ambas (Figura 3). Houve efeito significativo no número de vagens por planta, quando o isolado foi aplicado via pulverização semanal (Figura 4). Conseqüentemente, houve aumento no número de sementes por planta, nos tratamentos com UFV-74 pulverizado e microbiolizado e pulverizado (Figura 5). Também houve aumento significativo no peso médio das sementes, nos tratamentos onde UFV-74 foi inoculado, tanto via microbiolização quanto via pulverização (Figura 6). Observou-se também ganho no peso seco das plantas, quando microbiolizadas e pulverizadas com o isolado UFV-74 em relação à testemunha (Figura 7).

O ganho de peso das sementes afetou diretamente a produtividade. Os tratamentos onde se inoculou o isolado UFV-74, houve um aumento de até 25 % na produção, quando se compara os tratamentos com a testemunha (Figura 8).

Quanto a altura das plantas, o isolado UFV-74 promoveu o crescimento tanto em tratamentos em plantas pulverizadas quanto em plantas microbiolizadas quando comparadas à testemunha (Tabela 1).

O efeito de promoção de crescimento se manifestou inicialmente a partir dos 25 dias após a emergência, ou seja, 15 dias após a pulverização, mantendo-se constante até a última avaliação, em relação à testemunha (Figura 9).

O isolado foi identificado via sequenciamento do RNA 16S (Department of Genetics – Genome Research Unit. Universitat Kaiserslautern, Alemanha) como sendo *Pseudomonas putida*.

## DISCUSSÃO

Nos experimentos anteriormente apresentados, foi possível comprovar que microrganismos que encontram-se na filosfera de plantas podem atuar não só como agentes de biocontrole de patógenos (Windels & Lindow, 1985; Andrews, 1992; Bettiol, 1997; Elad *et al.*, 1999), mas como promotores do crescimento vegetal.

O efeito de microrganismos na estimulação dos crescimento vegetal, fenômeno bastante conhecido principalmente quando se trata de rizobactérias (Glick e Bashan, 1997; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000; Bloemberg & Lugtenberg, 2001), foi observado em plantas de feijoeiro, tanto nos experimentos realizados em casa de vegetação quanto em campo. O isolado UFV-74, agora identificado como *Pseudomonas putida* promoveu o aumento da área foliar, da altura das plantas, do número de vagens por planta, do peso de sementes e da produção, como esperado par um microrganismo promotor de crescimento.

A estratégia de se testar 500 isolados em casa de vegetação quanto a atividade de promoção de crescimento parece ter sido a mais correta, haja vista que, desses 500 isolados, apenas quatro foram capazes de aumentar a área foliar das plantas e desses quatro, apenas um foi capaz de promover o crescimento da planta. A chance de se encontrar um microrganismo benéfico para a planta dentro do universo de microrganismos que habitam a superfície de plantas é mínima, principalmente se o número de isolados obtidos para se realizar os testes for pequeno. O número de isolados com efeitos benéficos obtidos nesses experimentos, estão muito próximos aos sugeridos por Chen *et al.* (1996). Os autores afirmam que apenas 0,6 % das bactérias que encontram-se associadas com plantas, especialmente na rizosfera, apresentam efeitos benéficos sobre as mesmas, seja no biocontrole de doenças, seja na promoção dos crescimento vegetal.

Embora os resultados ainda sejam preliminares, e não se possa afirmar qual mecanismo está atuando para promover o crescimento, existe uma hipótese: o gênero *Pseudomonas* possui diversas espécies inclusas entre aquelas capazes de promover o crescimento vegetal, em associações com raízes

(Buchenauer, 1998; Cattelan & Hartel, 2000; Summer, 1990; Kloepper, 1993; Glick & Bashan, 1996). Entre os mecanismos envolvidos no crescimento de plantas, foram descritos pelos autores a produção de fitormônios como: giberelinas, auxinas, citocininas e etileno ou de substâncias análogas a esses compostos. Algumas espécies do gênero, incluindo *P. putida*, são descritas também colonizando o filoplano como patógenos, bem como agentes de biocontrole (Blakeman & Brodie, 1977; Kloepper, 1993; Oliveira *et al.*; 1991 Wilson *et al.*, 1999).

Paralelamente, alguns autores descrevem que, bactérias presentes no filoplano de plantas, produzem hormônios vegetais com efeito direto no crescimento, seja na germinação da semente (Holland, 1997b; Stebbins *et al.*, 1992), seja no desenvolvimento da planta, nos seus estádios iniciais de crescimento pós-germinação (Holland, 1997a; Holland & Polacco, 1992; Miller, 1965).

Se *P. putida* e outras espécies de *Pseudomonas* produzem fitormônios quando colonizam o sistema radicular; se esses hormônios, quando produzidos por outras bactérias que colonizam filoplano, auxiliam o crescimento vegetal e; sabendo que *P. putida* também é capaz de colonizar o filoplano de diversas espécies de plantas, então, é plausível supor que, o efeito de promoção de crescimento observado nas plantas de feijoeiro, poderia estar sendo induzido pela ação de fitormônios produzidos por *P. putida* (UFV-74), quando suspensões de células da bactéria foram pulverizadas na superfície das folhas de feijoeiro ou mesmo quando as sementes foram microbiolizadas.

O isolado UFV-74 foi eficiente em aumentar a produtividade das plantas de feijoeiro, quando aplicado como uma rizobactéria, via microbiolização de sementes, bem como quando aplicada na superfície de folhas, como um residente de filoplano. Esse isolado também teve efeito como agente biocontrolador da mancha angular e do crestamento bacteriano (artigo1), demonstrando a potencialidade do isolado, tanto como agente de biocontrole de doenças como promotor do crescimento vegetal.

A associação dos métodos de microbiolização de sementes e pulverização das plantas com o isolado pode ser uma estratégia interessante, uma vez que houve ganhos tanto no peso final das sementes como na

produtividade. Possivelmente, isso esteja correlacionado com o aumento no peso da planta seca, favorecida tanto pelo aumento da área fotossintética quanto pelo aumento da absorção de nutrientes e pelo aumento das raízes. Deve-se levar em conta ainda que, o isolado foi pulverizado nas folhas e sementes foram microbiolizadas, na forma de células nuas, o que reduz consideravelmente a viabilidade das células do isolado, devido aos efeitos da radiação UV, da dessecação pelos ventos, antagonismo com outros microrganismos do solo e das folhas, etc. É necessário o desenvolvimento de formulações que aumentem a taxa de viabilidade de células dos antagonistas na superfície das folhas e no solo. Também é necessário estudo aprofundado de formas de aplicação, tipo de formulação (líquida ou em pó), número de aplicações necessárias para se conseguir o máximo de produção por planta, testes toxicológicos do isolado contra aves, peixes, insetos, algas e mamíferos, bem como os custos de cada aplicação. Os resultados desses estudos serão fundamentais para a determinação da viabilidade de produção e comercialização de uma formulação comercial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4<sup>th</sup>, San Diego, Academic Press, 1997. 635p.
- ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & ZIMMERMANN, M. J.O. (ed.) **Cultura do Feijoeiro no Brasil**, Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1996, 786p.
- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. Bacterial of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.89, n.5, 353-359, 1999.
- BEAUCHAMP, C. J. Mode d'action des rhizobacteries favorisant la croissance des plantes et potential de leur utilization comme agent de lutte biologique. **Phytoprotection**, v. 74, n.1, p. 19-27, 1993.
- BLACKEMAN, J. P. & BRODIE, I. D. S. Competition for nutrients between epiphytic micro-organisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. **Physiological Plant Pathology**, v.10, p29-42, 1977.
- BLOEMBERG, G. V. & LUGTENBERG, J. J. Molecular basis of growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Pathology**, v. 1, n. 4, p. 343-350, 2001.

- BRAUN-KIEWNICK, A.; JACOBSEN, B. J. & SANDS, D. C. Biological Control of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, the Causal Agent of Basal Kernel Blight of Barley, by Antagonistic *Pantoea agglomerans*, **Biological Control**, v. 90, p.368-375, 1999.
- BUCHENAUER, H. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. **Journal of Plant Disease and Protection**, v.105, n.4, p.329-348, 1998.
- CATTELLAN, A.J. HARTEL, P.G. **Traits associated with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)**. In: Tópicos em ciência do solo / Sociedade Brasileira de Ciência do solo. Viçosa, MG, 213-234, 2000.
- CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.& KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S. & GUPTA, V. K. (ed.) **Management of soil born diseases**, Ludhiana, Kalyani Publishers Co. 1996, p. 165-184.
- GYENIS, L.; ANDERSON, N. A. & OSTRY, M. E. Biological Control of Septoria Leaf Spot Disease of Hybrid Poplar in the Field. **Plant Disease**, v. 87, p.809-813, 2003
- GLICK, B. R. & BASHAN, Y. Genetic manipulation of plant growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. **Biotechnology Advances**, n. 15, v. 2, p. 353-378, 1997.
- HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R.S. & MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n. 6, p.638-643, 2004.
- HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and ephiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 624-653, 2000.
- HOLLAND M. A. & POLACCO, J. C. Effect of bacterial hormones in plants: considerations. **Plant Physiology**, v. 98, n. 10, p. 942-948.
- HOLLAND M. A. Occam's razor applied to hormonology. Are cytokinins produce by plants? **Plant Physiology**, v. 115, p. 865-868, 1997a.
- HOLLAND M. A. *Methylobacterium* and plants. **Receiving Research Development in Plant Physiology**. v.1, p. 207-213, 1997b.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969 – 979, 1970.

- KINKLE, L.L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.
- KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: F.B. METTING, Jr. (Ed). **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**, Marcel Dekker, New York, 1993. p. 255-274.
- KLOEPPER, J. W. & SCHROTH, M. N. Relationship of antibiosis plant growth-promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. **Phytopathology**, v. 71, n. 10, p. 1020-1024, 1981.
- KORSTEN, L.; DE VILLIERS, E. E.; WEHNER, F. C.; & KOTZÉ, J. M. Field Sprays of *Bacillus subtilis* and Fungicides for Control of Preharvest Fruit Diseases of Avocado in South Africa. **Plant Disease**, v.81,p.455-459, 1997.
- KURZE, S.; BAHL, H.; DAHL, R. & BERG, G. Biological Control of Fungal Strawberry Diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48. **Plant Disease**, v.85, p.529-534, 2001.
- LINDOW, S.E. & LEVEAU, J. H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.3, p. 238-243, 2002.
- LINDOW S. E. & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.
- LEBEN, C. Microorganisms on cucumber seedlings. **Phytopathology**, v.51, p.553-557, 1961.
- MADDEN, L. V. Measuring and modeling losses at the field level. **Phytopathology**, v.73, n.11, p.1591-1596.
- MILLER, C. O. Bacterial cytokinins interfere in plant development? **Proceedings Natural Academic Science USA**, v. 54, n. 12, 1052-1058.
- MONIER, J. M. & LINDOW, S. E. Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, n.1, p. 346-355, 2004.
- OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. & MUCHOVEJ, J. J. Population tendencies of *Pseudomonas chicorie* and *P. syringae* pv. *garcae* in young and mature coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, v.131, n. 2, p. 210-214, 1991.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**, Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2001, 297p.
- SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R.S.; CARRER-FILHO, R.; PEREIRA, J. L.A; MIZUBUTI, E. S. G & MOUTNEER, A. Induction of systemic resistance

by *Bacillus cereus*, against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n.2, p. 371-375, 2004.

SUMNER, M.E. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. **Adv. Soil Science**, v.12, p. 53-123, 1990.

STEBBINS, N. E.; HOLLAND, M.A. & POLACCO, J. C. *Methylobacterium* spp. in soybean rhizosphere. **Plant Physiology**, v. 99, n. 1, p. 33-36, 1992.

STEENHOUDT, O. & VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p.487-506, 2000.

WILSON, M.; HIRANO, S. S. & LINDOW, S. E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within leaf. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1435-1443, 1999.

WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological control on the phylloplane**, St. Paul, APS Press, 1985. 169 p.

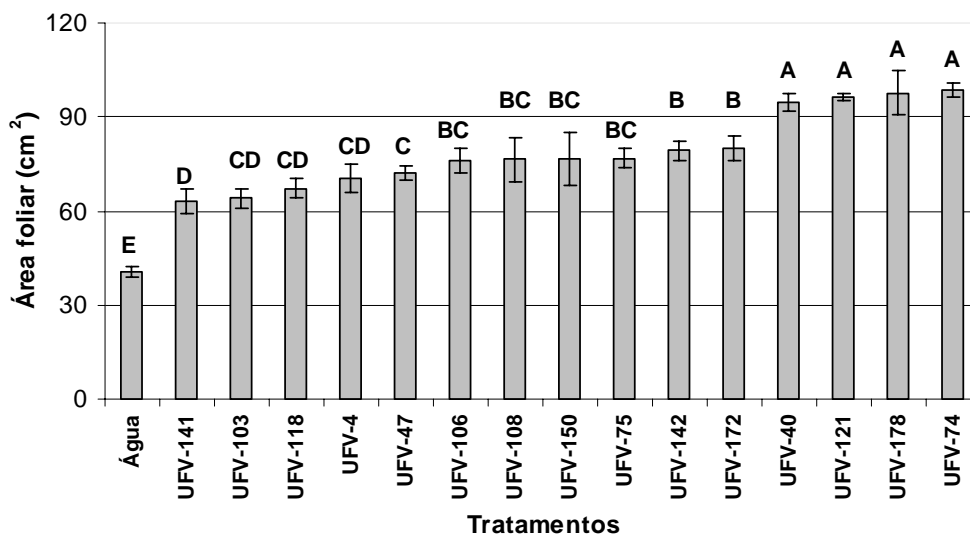


Figura 1-Média da área foliar (cm<sup>2</sup>) de plantas de feijoeiro previamente expostas aos isolados de procariotas residentes de filoplano que tiveram desempenho superior a testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

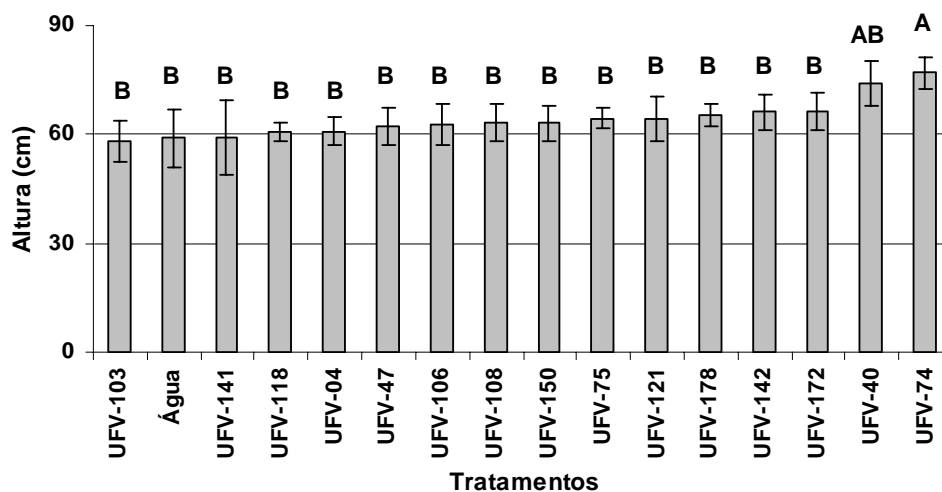


Figura 2-Média da altura de plantas de feijoeiro previamente expostas aos isolados de procariotas residentes de filoplano que tiveram desempenho superior a testemunha. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

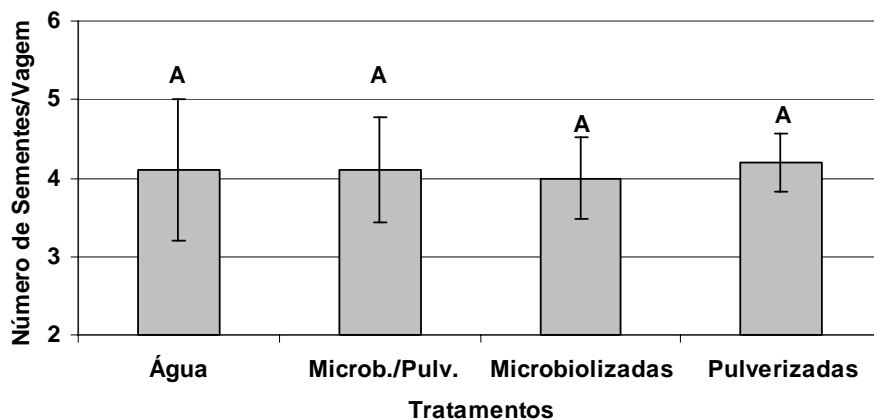


Figura 3-Média do número de sementes por vagem em plantas de feijoeiro previamente expostas ao isolado UFV-74. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

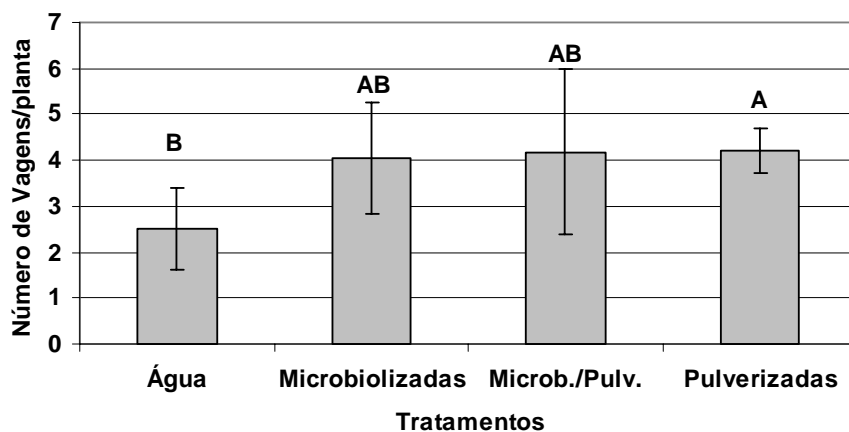


Figura 4-Média do número de vagens por planta em feijoeiros previamente expostos ao isolado UFV-74. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

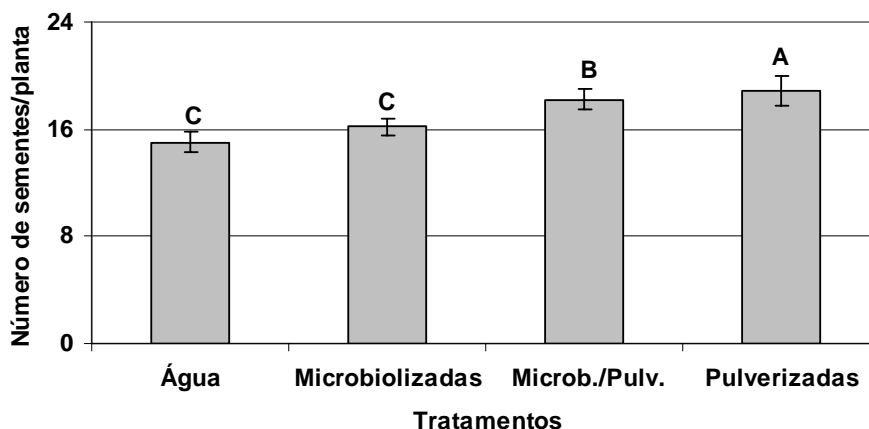


Figura 5-Média do número de sementes por planta em feijoeiros previamente expostos ao isolado UFV-74. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

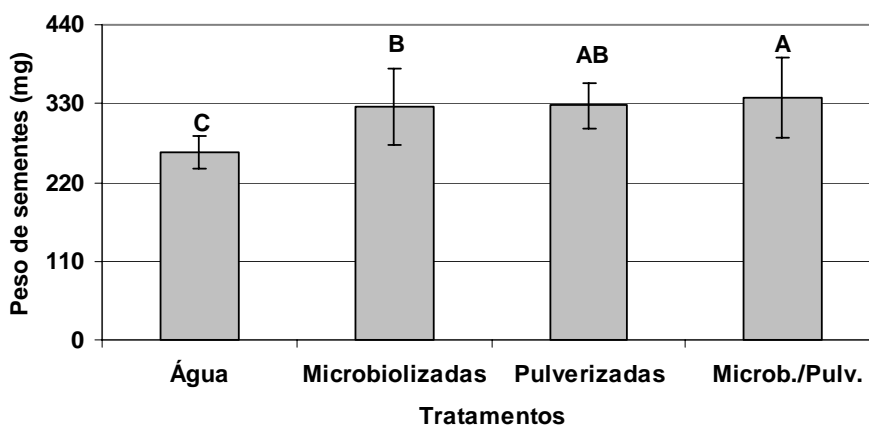


Figura 6-Peso médio de sementes de feijoeiro em plantas previamente expostas ao isolado UFV-74. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

Tabela1-Valores médios de área abaixo da curva de progresso de crescimento (AACPC) de plantas de feijoeiro cultivar Pérola em função do tratamento.

Tratamentos	AACPC*
Sementes microbiolizadas e plantas pulverizadas	1234,1 <b>a</b>
Sementes não-microbiolizadas e plantas pulverizadas	1219,75 <b>a b</b>
Sementes microbiolizadas e plantas não pulverizadas	1100,4 <b>b</b>
Sementes não-microbiolizadas e plantas não-pulverizadas	976,85 <b>c</b>

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância.

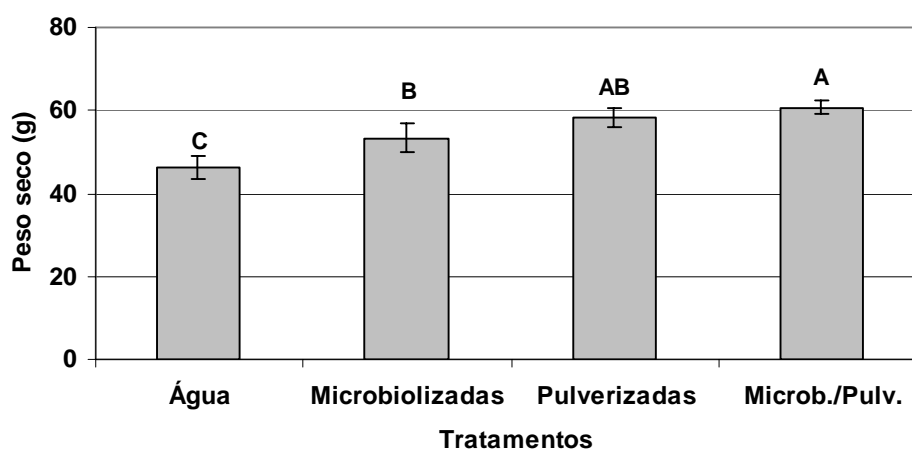


Figura 7-Peso seco médio de plantas de feijoeiro previamente expostas ao isolado UFV-74. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

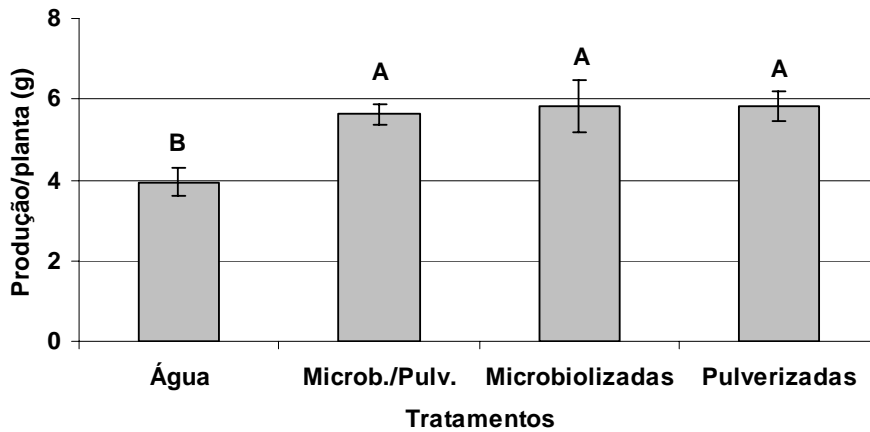


Figura 8-Produtividade média por planta em feijoeiro previamente expostas ao isolado UFV-74. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

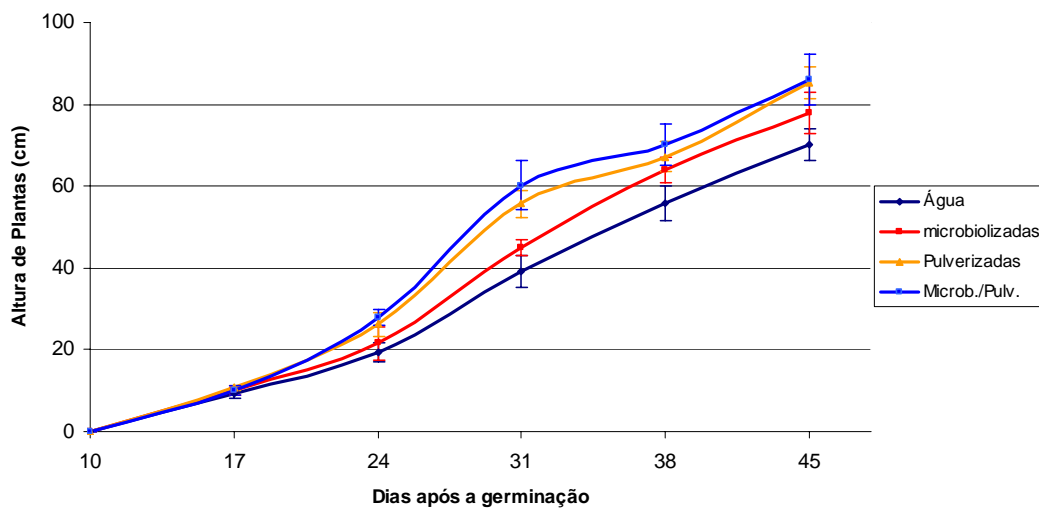


Figura 9-Curva de progresso de crescimento de plantas de feijoeiro cultivar Pérola previamente expostas ao isolado UFV-74. Legenda: Os traços verticais correspondem ao desvio padrão da média.

## ARTIGO 5

### COMPATIBILIDADE DE ISOLADOS DE PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO COM ANTIBIÓTICOS E PRODUTOS FITOSSANITÁRIOS REGISTRADOS PARA A CULTURA DO FEIJOEIRO.

#### RESUMO

Foi avaliada a sensibilidade “in vitro” dos procariotas residentes de filoplano UFV-172 e UVF-75 (*Bacillus cereus*) e UFV-108 (*Pseudomonas putida*), previamente selecionados como agentes de biocontrole de doenças de parte aérea da cultura do feijoeiro, a inseticidas, fungicidas e herbicidas, que têm sido mais comumente usados na cultura e, a antibióticos. Todos os produtos, exceto os antibióticos, foram testados nas doses comerciais, na metade da dose e no dobro da dose. Os antibióticos foram testados em apenas uma concentração. Em todos os casos, o método de difusão em dupla camada foi utilizado. Os fungicidas testados foram: Amistar, Cercobin 700 PM, Cerconil, Comet, Cupravit azul, Daconil BR, Folicur 200CE, Kumulus, Manzate 800, Opus, Pirate e Stratego; os inseticidas: Actara, Clorpirifós, Confidor, Decis 25 CE e Vertimec; os herbicidas: Basagran, Dual, Fusilad, Flex, Podium Robust, Sialex e Sweeper. Todos os agentes de biocontrole tiveram o crescimento inibido por Manzate 800, em todas as concentrações. Os isolados UFV-108 e UFV-172 foram sensíveis também ao Folicur 200 CE, na dose comercial e no dobro da dose. O isolado UFV-172 também apresentou sensibilidade aos produtos Bravonil (todas as doses), Cerconil (todas as doses). Os três isolados não foram sensíveis a nenhum dos herbicidas ou inseticidas em todas as doses testadas. Quanto aos antibióticos, os isolados apresentaram espectros de sensibilidade distintos, mas nenhum dos isolados foi sensível ou resistente a todos os 66 antibióticos testados. Estes resultados serão importantes futuramente, em tentativas de misturas de isolados e em planos de manejo de rotação de isolados e produtos comerciais e em outras pesquisas.

## ABSTRACT

Was evaluated the “in vitro” sensibility of prokaryotic phylloplane isolates UFV-172 and UVF-75 (*Bacillus cereus*) and UFV-108 (*Pseudomonas putida*), all of them previously selected as biocontrol agents for bean aerial part diseases, was tested against as far as insecticides, fungicides, herbicides eventually usable in commercial bean plantations and antibiotics are concerned. For all products except antibiotics, compounds were tested in the actual concentration recommended in commercial plantations as well as half and twice this value. Antibiotics were only tested at one concentration. In all situations, the double-layer diffusion assay was used. Tested fungicides: Cupravit azul, Comet, Cercobin 700 PM, Cerconil, Daconil BR, Folicur 200CE, Kumulus, Manzate 800, Opus, Pirate e Stratego; tested insecticides: Actara, Amistar, Confidor, Clorpirifós, Decis 25 CE e Vertimec; tested herbicides: Basagran, Dual, Fusilad, Flex, Podium Robust, Sialex e Sweeper. All biocontrol agents had their growth inhibited by Manzate 800, at all concentrations and isolates UFV-108 e UFV-172 were also sensitive to Folicur 200CE while isolate UFV-172 was also sensitive to Bravonil and Cerconil. None of isolates were sensitive to either insecticides or herbicides. In respect of antibiotics, the biocontrol agents presented a distinct spectrum of sensibility but every one was sensitive or resistant to several, considering 66 antibiotics tested. Our results are important in order to use mixtures of biocontrol agents to control several diseases and pesticides and for other research aims.

## INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos expandiu-se nas últimas quatro décadas. Neste contexto, o Brasil ocupa o nono lugar no ranking entre os 15 países que mais consomem agrotóxicos no mundo (FAOSTAT, 2005). O consumo de agrotóxicos é da ordem de 130.000 toneladas, entre herbicidas, fungicidas e inseticidas. Dentre as 15 culturas que mais se usa agrotóxicos, a cultura do feijoeiro situa-se na décima posição (Campanhola & Bettiol, 2003).

O potencial de impacto negativo do uso de defensivos agrícolas tem aumentado a cada dia, como a eliminação de inimigos naturais de pragas e doenças, com o surgimento de populações resistentes de patógenos aos produtos e com a ressurgência de pragas que já estiveram sobre controle (Campanhola *et al.*, 1998; Zambolim, 2001). Ademais, afeta o ambiente, via contaminação de lençóis freáticos, rios, solos, etc. e a população humana em geral, pelo consumo de produtos contaminados pela presença de resíduos dos produtos (Bettiol & Ghini, 2003) Estratégias de manejo integrado (Korsten *et al.*, 1997) que visem reduzir os efeitos do uso excessivo de agrotóxicos devem ser consideradas.

Nessa visão de uso racional de agrotóxicos, o controle biológico pode ser uma alternativa viável, pois, se por um lado auxilia na redução dos riscos de desequilíbrio do ecossistema natural e da contaminação daqueles que consomem os produtos com resíduos, por outro reduz o custo de produção para o produtor.

Mas para inserir agentes de controle biológico dentro da estratégia de manejo integrado de doenças, é necessário antes, realizar testes de compatibilidade entre os agentes de biocontrole e os produtos comerciais, a fim de se poder realizar misturas de antagonistas com produtos comerciais, planejar estratégias de aplicação alternadas entre produtos comerciais e antagonistas, objetivando o aumento da eficiência do controle das doenças (Tronsmo & Ystaas, 1980).

Alguns autores têm demonstrado que o uso combinado de agentes de biocontrole e produtos químicos pode ser uma estratégia eficiente. Elad *et al.* (1995) demonstraram que aplicações alternadas de fungicidas e do agente de controle biológico *Trichoderma harzianum*, foram mais eficientes que o uso de apenas um dos métodos, para o controle de *Botrytis cinerea* em tomateiro. Minuto *et al.* (1995) demonstraram que a aplicação em mistura de um isolado de *Fusarium* e um fungicida do grupo dos benzimidazoles, no controle da murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis* em ciclâmen foi mais eficiente que a aplicação de apenas um dos métodos. O mesmo foi observado por Duffy (2000) quando este aplicou o fungicida penicyuron junto com um isolado de *Pseudomonas fluorescens*, em sementes de trigo, para o controle de podridão das raízes causada por *Rhizoctonia solani*.

O uso de antibióticos na agricultura não tem sido muito recomendado, dada a ineficiência de controle de doenças bacterianas e devido aos problemas ambientais que podem acarretar (Romeiro, 2000). Por outro lado, são diversos os usos de antibióticos em pesquisa, tais como: seleção de microrganismos como agentes de biocontrole, isolamento, cultivo e manipulação de bactérias, produção de meios seletivos, estudos de tendências populacionais de bactérias em tecidos de plantas e no solo, etc. (Romeiro & Vieira-Júnior, 2005).

Este trabalho teve como objetivo determinar a sensibilidade *in vitro* dos isolados UFV-75 e UFV172 (identificados como *Bacillus cereus* via sequenciamento do RNA 16S no Department of Genetics – Genome Research Unit, Universität Kaiserslautern, Alemanha) e UFV-108 (identificado como *Pseudomonas putida* por análise de ácidos graxos), previamente selecionados como agentes de biocontrole de doenças do feijoeiro, a produtos registrados e a antibióticos, visando futura utilização de combinações dos isolados com esses produtos, para o controle de doenças da cultura.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Ensaio de sensibilidade a antibióticos

Células bacterianas de cada isolado foram transferidas para tubos de ensaio com meio 523 líquido (Kado & Heskett, 1970). Após 24h, tomou-se uma alíquota de 300µL da cultura e esta foi transferida para um erlenmeyer contendo 30 mL de meio 523 semi-sólido fundente, agitando-se levemente.

A mistura foi vertida em placa de Petri de nove cm de diâmetro e, após solidificação, discos de antibióticos foram dispostos na superfície do meio. Foram feitas três repetições para cada antibiótico testado. As placas foram mantidas em incubadora tipo B.O.D. a 25 °C, por 48h, quando avaliou-se a presença ou não de halos de inibição (Romeiro, 2001).

Foram testados os seguintes 66 antibióticos. Entre parênteses são apresentadas as concentrações de cada antibiótico: São eles: ácido nalidíxico (30 µg), ácido oxolínico (30 µg), ácido pipemídico (20 µg), ácido clavulânico + amoxicilina (30 µg), amicacina (30 µg), amoxicilina (10 µg), Amoxicilina (5 µg), + penicilina (5 µg), azitromicina (15 µg), aztreonama (30 µg), bacitracina

(10 u.i.), carbenicilina (100 µg), cefaclor (30 µg), cefadroxil (30 µg), cefalexina (30 µg), cefalotina (30 µg), cefazolina (30 µg), cefepima (30 µg), cefetamet (10 µg), cefixima (5 µg), cefodizima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefuroxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), claritromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), cotrimoxazol (25 µg), doxiciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), espiramicina (100 µg), estreptomicina (10 µg), fosfomicina (50 µg), furazolidona (100 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), kanamicina (30 µg), levofloxacina (5 µg), lincomicina (2 µg), lomefloxacina (10 µg), neomicina (30 µg), netilmicina (30 µg), nitrofurantoína (300 µg), nitrofurazona (50 µg), norfloxacina (10 µg), ofloxacina (5 µg), optoquina (5 µg), oxacilina (1 µg), pefloxacina (5 µg), penicilina (10 µg), polimixina (300 µg), rifampicina (5 µg), sulbactam (10 µg) + ampicilina (10 µg), sulfadiatrim (25 µg), sulfazotrim (25 µg), sulfonamida (300 µg), teicoplanina (30 µg), tetraciclina (30 µg), tianfenicol (30 µg), ticarcilina (75 µg) + ácido clavulânico (10 µg), tobramicina (10 µg), trimetoprim (5 µg), vancomicina (30 µg).

### **Ensaio de sensibilidade a produtos comerciais**

Para determinar a sensibilidade dos isolados aos produtos fitossanitários registrados para a cultura do feijoeiro no Brasil, utilizou-se o bioensaio descrito por Klement *et al.* (1990). Discos de papel, tipo Whatman, nº1, de 0,5 cm de diâmetro, foram preparados e esterilizados. No disco esterilizado, foi depositada uma gota de 20 µL do produto, preparado nestas doses: comercial (DC), dobro da dose comercial (DD) e a metade da dose comercial (MD). Os discos foram deixados sob fluxo laminar até a secagem.

Células bacterianas de cada isolado foram transferidas para tubos de ensaio com meio 523 líquido (Kado & Heskett, 1970). Após 24h, tomou-se uma alíquota de 300µL da cultura e esta foi transferida para um erlenmeyer contendo 30 mL de meio 523 semi-sólido fundente, agitando-se levemente. A mistura foi vertida em placa de Petri de nove cm de diâmetro e, após solidificação, os discos secos foram depositados equidistantemente sobre o meio. Foram feitas três repetições para cada antibiótico testado. As placas foram mantidas em incubadora tipo B.O.D. a 25 °C, por 48h, quando avaliou-se a presença ou não

de halos de inibição (Romeiro, 2001). A seguir, são listados os produtos testados, as doses comerciais e as respectivas concentrações das suspensões depositadas sobre os discos. Foram testados os seguintes produtos: **i) fungicidas:** Amistar (0,6-128g/ha-600L/ha; 0,256g/L), Bravonil 750 PM (1,4Kg/ha-400L/ha de calda; 3,5g/L), Cercobin 700 PM (70g-100L; 0,07g/L), Cerconil PM ( 1,5 Kg./ha-800L/ha; 2,0g/L), Comet (0,3 L/ha-200L/ha; 1mL/L), Cupravit Azul Br (3 kg/ha-300L/ha; 10 g/L), Folicur 200 CE (1L/ha-300L/ha; 3,33mL/L), Kumulus DF (300g/ha-100L/ha; 0,6g/L), Manzate 800 (2 Kg./ha-300L/ha; 6,66g/L), Opus (0,1L/ha-200L/ha; 0,33mL/L), Sialex 500 (1,5Kg/ha-1000L/ha; 1,5g/L) e Stratego 250 CE (0,75L/ha-250L/ha; 2,5mL/L); **ii) inseticidas:** Actara 250 WG (150g /ha- 200L/ha;0,75g/L), Clorpirifós 480 CE (0,8L/ha-400L/ha; 2mg/L), Confidor GrDa (250g/ha-300L/ha; 0,83g/L), Decis 25 CE 160mL/ha-200L/ha; 0,8mL/L), Pirate (750mL/ha-300L/ha; 2,5mL/L) e Vertimec 18CE (0,3-0,6L/ha-500L/ha; 1,2mL/L); **iii) herbicidas:** Basagram 600 (1,2 L/ha-250L; 4,8mL/L), Dual Gold (1,25 L/ha-300L/ha; 4,17mL/L), Flex (0,9-1L/ha-300L/ha; 3,33mL/L), Fusilade 250 EW (0,5 L/ha-300L/ha; 1,6mL/L), Podium (0,625L/ha-400L/ha; 1,56mL/L), Robust (0,8L/ha-300L/ha; 2,66mL/L) e Sweeper (40-60g/ha-300L/ha; 0,2g/L); **iv) adjuvantes:** Actflo (0,5% v/v), Blendmax (1% v/v), Break-thru (0,15% v/v), Dyne-amic (0,5% v/v), Glicerina (0,5% v/v), Intac (1,5% v/v), Kinetic (0,5% v/v), Metamucil (0,5% p/v), Óleo Mineral (5% v/v), Silweet 77 (0,2%v/v), Sun Spray oil (3% v/v) e Tween 80 (0,2% v/v).

## RESULTADOS

Dos 66 antibióticos testados, apenas 14 não inibiram o crescimento dos isolados UFV-108 e UFV-172. e 17 não inibiram o crescimento UFV-75 (Tabela 1).

Dentre os produtos comerciais, apenas o fungicida Manzate 800 inibiu o crescimento de todos os isolados em todas as doses testadas. O fungicida Cupravit inibiu os três isolados, quando testado nas doses comercial e dobro da dose comercial. Os isolados UFV-108 e UFV-172 foram sensíveis ao fungicida Folicur 200 CE, na dose comercial e no dobro da dose comercial. O isolado

UFV-172 também apresentou sensibilidade aos produtos Bravonil 750 PM e Cerconil em todas as doses testadas (Tabela 2).

Nenhum dos isolados foi sensível a qualquer dos adjuvantes em todas as doses testadas.

## DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios com antibióticos demonstraram que a sensibilidade dos isolados a esses produtos é bastante elevada, haja vista que dos 66 antibióticos testados, os isolados foram insensíveis a no máximo 17 deles. Essa sensibilidade pode ser considerada normal, haja vista que esses isolados foram obtidos de filoplano de feijoeiros sadios, em cultivos onde não houve pulverizações com antibióticos.

Os testes de sensibilidade dos isolados com antibióticos dão uma informação importante quanto à identidade de dois dos isolados testados: UFV-75 e UFV-172. Ambos foram identificados como pertencentes à mesma espécie (*Bacillus cereus*) e foram obtidos de uma mesma área de plantio de feijoeiro. Poderia ser sugerido que UFV-172 e UFV-75 fossem o mesmo indivíduo. Com os resultados dos testes de sensibilidade, em que o espectro de sensibilidade de um isolado foi diferente do outro, comprova-se que embora sejam a mesma espécie, tratam-se os indivíduos diferentes.

Atualmente, é ponto pacífico que o uso de antibióticos na agricultura não é recomendado, exceto em casos muito específicos e, mesmo assim, com eficiência questionável (Romeiro & Vieira-Júnior, 2005). Porém, para fins de pesquisa, são excelentes. Por exemplo, os resultados obtidos foram úteis para ensaios de indução de resistência e repressividade de crescimento (artigo 8).

Também os resultados dos ensaios de sensibilidade, serão úteis futuramente nos ensaios de compatibilidade entre isolados UFV-75, UFV-108 e UFV-172. Nesse tipo de estudo dois isolados são colocados para crescerem juntos em meio de cultura líquido e, usando dois conjuntos de placas de Petri contendo, em cada conjunto, um antibiótico que iniba um dos dois isolados é possível contar o número de células viáveis de cada isolado ao longo do tempo. A partir daí pode-se determinar se um isolado afetaria a sobrevivência do outro

numa futura formulação. Nesse tipo de estudo é preciso possuir a gama de sensibilidade dos isolados aos antibióticos, para que, pelo menos um antibiótico seja capaz de inibir o crescimento de um dos isolados e não inibir o outro e vice-versa (Stanier *et al.*, 1969; Romeiro, 2000).

Os resultados do teste de sensibilidade a antibióticos também serão úteis nos estudos de sobrevivência dos isolados na superfície de folhas. Esse tipo de estudo pode ser feito de três maneiras: usando-se genes de fluorescência, transformando-se as bactérias, pela inserção do plasmídeo que apresenta o gene que codifica para a proteína de fluorescência; usando-se mutantes insensíveis a um determinado antibiótico ou; aproveitando-se da própria resistência múltipla constitutiva do isolado à um grupo de antibióticos (Romeiro *et al.*, 1998). O primeiro caso, demanda a obtenção do plasmídeo ou da própria bactéria transformada, o que é caro e de difícil aplicação prática, uma vez que demanda autorização do Ministério do Meio Ambiente, para aplicação dos isolados transformados no campo. O segundo caso demanda muito tempo, pois é difícil obter um mutante resistente a altas concentrações de um antibiótico (Oliveira *et al.*, 1991). O terceiro caso é mais simples, pois, poderão ser utilizados os resultados dos testes realizados nesse trabalho, adotando-se três ou mais antibióticos aos quais o isolado foi insensível.

Os resultados demonstram que o uso de alguns fungicidas em associação aos isolados, poderá não ser possível. A sensibilidade dos isolados foi marcadamente observada contra dois fungicidas: cupravit azul br e manzate 800. O primeiro, trata-se de um fungicida a base de cobre, sobre o qual há relatos na literatura sobre sua ação inibidora de bacterioses de plantas (Oshima e Dickens, 1971; Yunis *et al.*, 1980; Romeiro, 2000). Alguns autores também relatam efeitos de fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos, como o manzate, sobre bactérias, em especial quando estão associados com fungicidas cúpricos. O efeito desses fungicidas sobre bactérias parece estar associado à presença na composição dos mesmos dos íons inorgânicos cobre e zinco (Adaskaveg & Hine, 1985; Conlin & McCarter, 1983; Marco & Stall, 1983).

O grande problema é que, o cupravit e o manzate estão dentro dos produtos utilizados mais comumente para o controle de doenças na cultura, pois apresentam baixo custo de aquisição, apresentam boa eficiência de controle e

pouca chance dos patógenos se tornarem resistentes a eles. Isso torna a introdução de um formulado biológico no contexto de manejo integrado mais difícil (Van Lenteren, 2000), pois o produtor tem resistência a utilizar outros produtos, que são mais caros, embora os isolados possam ser utilizados em associação com outros produtos, como inseticidas e herbicidas, o que pode tornar a idéia de utilizá-los mais atrativa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASKAVEG, J.E. & HINE, R.B. Copper tolerance and enzyme sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris*pv. *Vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. **Plant Disease**, v.29, p.993-996, 1983
- BETTIOL, W. & GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, p. 79-96, 2003.
- CAMPANHOLA, C.; RODRIGUES, G. S. & BETTIOL, W. Evolução, situação atual, projeção e perspectiva de sucesso de um Programa de Racionalização do Uso de agrotóxicos no Brasil. In: RODRIGUES, G. S. **Racionalización del uso de pesticidas en el Cono Sur**. Montevideo, PROCISUR, 1998. p. 43-49.
- CAMPANHOLA, C. & BETTIOL, W. (ed.) **Métodos alternativos de controle fitossanitário**, Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2003. 279p.
- CONLIN, K. C. & McCARTER, S. M. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in vitro and in controlling of the bacterial speck. **Plant Disease**, v.67, p.639-644, 1993.
- DUFFY, B. Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of rhizoctonia root rot and take-all offspring wheat. **Crop Protection**, v.19, n.1, p. 21-25, 2000.
- ELAD, Y.; GULLINO, M.L.; SHTIENBERG, D. & ALOI, C. Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes greenhouses in Mediterranean. **Crop Protection**, v.14, n.2, p.105-109, 1995.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations-Agricultural-Database.  
In: [faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture](http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture) (último acesso em 11 de Abril de 2005). 2005.

- KADO, C. I. & HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969 – 979, 1970.
- KLEMENT, Z; RUDOLF, K. & SANDS, D. C. **Methods in phyto bacteriology**, Budapest, Akademiai Kiadó, 1990, 568p.
- KORSTEN, L.; De VILLIERS, E.E.; WEHNER, F.C. & KOTZÉ, J. M. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in South America. **Plant Disease**, v.81, n.5, p.455-459, 1997.
- MARCO, G. M. & STALL, R. E. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. **Plant Disease**, v. 67, p.779-781, 1983.
- MINUTO, A.; MICHELI, Q. & GARIBALDI, A. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. In the biological control and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen. **Crop Protection**, v.14, n.3, p.221-226, 1995.
- OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. & MUCHOVEJ, J. J. Population tendencies of *Pseudomonas chicorie* and *P. syringae* pv. *garcae* in young and mature coffee leaves. **Journal of Phytopathology**, v.131, n. 2, p. 210-214, 1991.
- OSHIMA, N. & DICKENS, L. E. Effects of copper sprays on secondary spread of common bacterial blight of beans. **Plant Disease Reporter**, v.55, n.7, p.609-610, 1971.
- ROMEIRO, R. S.; MOURA, A. B.; OLIVEIRA, J. R.; SILVA, G. S. A.; BARBOSA, L. S.; SOARES, F. M. P. & PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, v. 24, n.2, p. 213-218, 1998.
- ROMEIRO, R. S.; **Bactérias fitopatogênicas**, Viçosa, Imprensa. Universitária, 2000, 283p.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**, Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2001, 297p.
- ROMEIRO, R.S. & VIEIRA-JUNIOR, J. R. Importância de antibióticos para o controle de fitopatógenos e para outras finalidades em Fitopatologia. **Summa Phytopathologica**, v. 31, supl. p.116-119, 2005.
- STANIER, R.Y.; DOUDUROFF, M. & ADELBERG, E.A. **Mundo dos Micróbios**, São Paulo, Editora Universidade de São Paulo, 1969. 741p.
- TRONSMO, A. & YSTAAS, J. Biological control of *Botrytis cinerea* on apple. **Plant Disease**, v. 19, n.6, p.375-384, 1980.

VAN LETEREN, J. C. A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? **Crop Protection**, v.19, n.6, p.375-384, 2000.

YUNIS, H.; BASHAN, Y.; OKON, Y. & HENIS, Y. Weather dependence, yield losses and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. **Plant Disease**, v.65, n.10, p.937-939, 1980

ZAMBOLIM, L. (ed.). **Manejo Integrado-Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**. Viçosa, Depto. de Fitopatologia, 2001.722p.

Tabela 1 - Diâmetro médio do halo de inibição (cm) dos isolados de procariotas residentes de filoplano testados contra diferentes antibióticos.\*

Antibiótico	Isolado			Antibiótico	Isolado		
	75	108	172		75	108	172
Ácido nalidíxico	4,0	1,8	3,7	Estreptomicina	4,5	4,0	5,0
Ácido oxolínico	1,1	2,0	0,9	Fosfomicina	2,2	1,9	2,8
Ácido pipemídico	0,5	1,0	1,0	Furazolidona	1,1	2,0	3,0
Ac. clavulânico + Amoxicilina	3,0	4,0	2,5	Gentamicina	3,3	2,1	3,5
Amicacina	3,0	4,0	2,0	Imipenem	2,2	2,0	2,0
Amoxicilina	4,9	4,0	6,0	Kanamicina	4,0	3,4	4,1
Amoxicilina + Penicilina	4,2	4,2	3,6	Levofloxacina	1,1	2,1	0,7
Azitromicina	2,2	4,5	3,0	Lincomicina	1,7	1,3	2,4
<b>Aztreonam</b>	0,0	0,0	0,0	Lomefloxacina	2,6	1,6	1,8
<b>Bacitracina</b>	4,1	0,0	3,2	Neomicina	4,0	3,2	4,1
<b>Carbenicilina</b>	0,0	2,2	3,2	Netilmicina	0,6	2,0	1,0
Cefaclor	1,8	2,1	1,0	Nitrofurantoína	2,2	3,0	2,7
Cefadroxil	0,5	0,9	0,5	Nitrofurazona	1,2	2,7	1,5
Cefalexina	1,1	0,5	2,0	Norfloxacina	4,0	3,8	4,2
Cefalotina	0,5	0,8	1,0	Ofloxacina	0,5	0,7	0,4
<b>Cefazolina</b>	0,0	2,0	2,2	<b>Optoquina</b>	0,0	0,0	0,0
<b>Cefepime</b>	0,0	0,0	0,0	<b>Oxacilina</b>	0,0	0,0	0,0
<b>Cefetamet</b>	0,0	0,0	0,0	Pefloxacina	1,7	2,0	1,6
Cefixima	0,5	2,1	0,8	Penicilina G	4,0	4,4	3,6
<b>Cefodizima</b>	0,0	2,0	1,5	Polimixina	2,2	4,1	2,7
<b>Cefotaxima</b>	0,0	2,2	1,0	Rifampicina	4,0	4,0	4,0
Cefoxitina	2,5	1,0	1,1	Sulbactam	1,2	0,6	2,0
<b>Ceftriaxona</b>	0,0	2,0	1,0	Ampicilina	5,0	4,2	4,8
<b>Ceftazidima</b>	0,0	0,0	0,0	<b>Sulfadiatrim</b>	0,0	0,0	0,0
<b>Cefuroxima</b>	0,0	0,0	0,0	<b>Sulfazotrim</b>	0,0	0,0	0,0
<b>Ciprofloxacina</b>	0,0	3,0	3,5	<b>Sulfonamida</b>	0,0	0,0	0,0
Claritromicina	4,0	2,8	2,9	Teicoplanina	2,0	2,7	3,0
Clindamicina	2,0	3,0	2,6	Tetraciclina	4,0	5,5	3,9
Cloranfenicol	6,0	4,3	5,2	Tianfenicol	2,0	1,5	2,2
<b>Cotrimoxazol</b>	1,7	0,0	0,0	Ticarclina + Ác. clavulânico	2,2	2,7	2,5
Doxiciclina	1,0	0,5	1,4	Tobramicina	3,6	4,0	3,0
Eritromicina	4,0	5,1	3,2	<b>Trimetoprim</b>	0,0	0,0	0,0
Espiramicina	2,0	2,9	1,4	Vancomicina	2,7	4,1	3,0

\*Estão marcados negrito os antibióticos os quais pelo menos um dos isolados foi insensível.

Tabela 2 – Diâmetro médio do halo de inibição (cm) dos isolados de procariotas residentes de filoplano testados contra produtos fitossanitários recomendados para a cultura do feijoeiro.

Produto Comercial*	UFV 108			UFV 75			UFV 172		
	Doses			Doses			Doses		
	DD <sup>a</sup>	DC <sup>b</sup>	MD <sup>c</sup>	DD	DC	MD	DD	DC	MD
Actara	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Amistar	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Basagran	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Confidor	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Cupravit Br</b>	4,0	1,7	0,0	2,7	1,1	0,0	3,5	1,5	0,0
Comet	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Cercobin 700 PM</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,9	0,5
Clorpirifós	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Bravonil 750 PM</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	1,5	0,9
Decis 25 CE	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dual	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Folicur 200 CE</b>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,6	1,5	0,0
Fusilad 125	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Flex	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Kumulus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Manzate 800</b>	4,0	2,2	1,0	4,2	2,4	1,3	4,5	2,5	1,3
Opus	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pirate	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Podium	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Robust	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sialex	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Stratego	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Sweeper	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Vertimec	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

\* Estão marcados em negrito os produtos comerciais os quais pelo menos um dos isolados foi sensível

Legenda: a) DD – Dobro da dose comercial; b) DC – Dose comercial; c) MD - Metade da dose comercia

## ARTIGO 6

### BIOCONTROLE DE DOENÇAS DO FEIJOEIRO COM PROCARIOTAS RESIDENTES DO FILOPLANO EM FUNÇÃO DA CULTIVAR, DA IDADE DAS PLANTAS E DO TIPO DE PATÓGENO.

#### RESUMO

A eficácia dos isolados UFV-75, UFV-172 (*Bacillus cereus* e UFV-108 (*Pseudomonas putida*) previamente selecionados como agentes de biocontrole de doenças foliares do feijoeiro, foi investigada em função: da cultivar, da idade da planta e do espectro de patógenos, em casa de vegetação. No primeiro experimento, os agentes de biocontrole foram pulverizados (suspensão de células,  $OD_{540nm} = 0,4$ ) sobre plantas de feijoeiro cultivar Pérola, com 30 dias de idade e, quatro dias depois, inocularam-se os patógenos desafiante *Pseudomonas viridiflava* (Pv),  $OD_{540nm}=0,2$ ; *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl),  $8,5 \times 10^5$  conídios/mL); *Phaeoisariopsis griseola* (Pg),  $10 \times 10^4$  conídios/mL e *Erysiphe polygoni* (Ep),  $1,5 \times 10^5$  conídios/mL). No segundo ensaio, plantas com idades entre 10 e 80 dias após a emergência, foram pulverizadas com os agentes de biocontrole como descrito anteriormente e, após quatro dias, o patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap;  $A_{540nm} = 0,2$ ) foi inoculado. O terceiro ensaio consistiu da pulverização dos isolados, como descrito anteriormente, em plantas de feijoeiro, com 30 dias de idade. Foram empregadas as cultivares Pérola, Valente, Ouro Negro, Diamante Negro, Talismã, Meia-Noite, Radiante, Vermelhinho e Manteigão. Quatro dias após, inoculou-se *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, como descrito anteriormente. Em todos os experimentos, a quantificação da intensidade das doenças foi feita por meio da contagem de lesões de Xap, Pv e Pg. Foram usadas escalas diagramáticas para avaliar Ep e Cl. Nenhum agente de biocontrole foi capaz de controlar a doença em plantas com idade superior a 70 dias após a germinação; b) Os três isolados foram eficazes em controlar o crestamento bacteriano em todas as cultivares testadas; c) Os isolados reduziram a severidade de todos os patógenos testados, quando comparados com a testemunha com água. Estes

resultados enfatizam a potencialidade dos isolados UFV-75, UFV-172 e UFV-108 como agentes de biocontrole.

### ABSTRACT

The effectiveness of the previously selected biocontrol agents UFV-75, UFV-172 (*Bacillus cereus*) and UFV-108 (*Pseudomonas putida*) was investigated as far as the parameters cultivar, plant age and activity spectrum against multiple pathogens are concerned, under greenhouse conditions. In a first experiment, biocontrol agents were delivered (spray, propagule suspension,  $OD_{540} = 0,4$ ) to 30 days old bean plants ('Perola') and, 4 days later, the challenging pathogens were inoculated as follows: *Pseudomonas viridiflava* (Pv),  $OD_{540} = 0,2$ ; *Colletotrichum lindemuthianum* (Cl),  $8,5 \times 10^5$  conidia/mL); *Phaeoisariopsis griseola* (Pg),  $10 \times 10^4$  conidia/mL and *Erysiphe polygoni* (Ep),  $1,5 \times 10^5$  conidia/mL). In a second assay, to bean plants whose age ranged from 10 to 80 days, the biocontrol agents were delivered as previously described and, after 4 days, the model pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap, cell suspension spray,  $OD_{540} = 0,2$ ) was inoculated. The third assay consisted in delivering the biocontrol agents as previously described to 30 days old bean plants belonging to the cultivars Pérola, Valente, Ouro Negro, Diamante Negro, Talismã, Meia-Noite, Radiante, Vermelhinho e Manteigão and, 4 days after, inoculation of the pathogen as described in experiment 2. In all experiments, disease quantification was performed by counting lesions for Xap, Pv e Pg and by using a diagrammatic scale for Ep e Cl. Results:a) no biocontrol agent was able to protect old plants (older than 70 days); b) All isolates protected all cultivars against bacterial blight; c) All isolates protected was efficient against all tested pathogens. These results emphasize the potentiality of isolates UFV-75, UFV-172 and UFV-108 as biocontrol agents of common bean foliar diseases.

## INTRODUÇÃO

Embora o Brasil seja o maior produtor mundial de feijão, com uma produção média superior a três milhões de toneladas em quatro milhões de hectares de área plantada ao longo do país (FAOSTAT, 2005) a produtividade média da cultura está abaixo de muitos países de menor expressão, como Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia e etc. (FAOSTAT, 2005).

A redução da produtividade está certamente correlacionada com a ocorrência de doenças durante o ciclo da cultura (Sartorato & Rava, 1994) que podem levar a perdas superiores a 60% da produção (Hall, 1994; Vale & Zambolim, 1997).

No país, existem diferentes cultivares recomendadas em função da região e da tradição de plantio de um determinado grupo de grãos (Zimmermann *et al.*, 1996). Essas cultivares apresentam níveis de resistência à patógenos variados, muitas vezes sendo resistentes a uma ou poucas doenças. Como exemplo, na Zona da Mata de Minas Gerais tem se plantado cultivares como pérola e ouro negro, com maior frequência em áreas de produção comercial e o vermelho em áreas mais tradicionais, onde predominam pequenos produtores. (Ramalho & Abreu, 1998). Algumas dessas cultivares são suscetíveis a doenças importantes na região, como o crestamento bacteriano comum, a ferrugem, a antracnose e a mancha angular (Ramalho & Abreu, 1998). Como o plantio é feito em mais de uma época do ano, a quantidade de inoculo do patógeno se mantém elevada, favorecendo a ocorrência de epidemias e a sobrevivência do patógeno no campo (Paula Júnior e Zambolim, 1998).

Ademais, o feijoeiro é uma cultura de baixo valor comercial, se comparado com hortaliças como tomate ou grandes culturas como a soja e, muitas vezes, o controle químico não é utilizado, devido o baixo retorno econômico obtido e o alto custo dos produtos comerciais. Some-se a isso o grande número de raças, com elevados níveis de agressividade, dos patógenos de parte aérea da cultura, têm-se um panorama do porque da redução de produtividade (Zambolim, 2001).

Nesse contexto, o controle biológico parece se inserir adequadamente no contexto de manejo integrado de doenças, pois um dos efeitos positivos de

muitos microrganismos selecionados como agentes de biocontrole é sua amplitude de controle (Halfeld-Vieira, 2002; Romeiro *et al*, 2000).

Na busca de se selecionar bactérias residentes de filoplano como agentes de biocontrole de doenças, deve-se levar em consideração que esses microrganismos podem apresentar desempenho variável, em função da cultivar, da idade da planta, do patógeno e fatores ambientais, como a ação da radiação UV, ventos, chuva, a fatores nutricionais na própria superfície do filoplano, etc. (Andrews & Hirano, 1991; Jacob, 1997; Kinkle, 1997; Lindow & Brandl, 2003). Esses fatores fazem com que a população no filoplano varie muito, ao longo do ciclo da cultura.

Objetivou-se neste trabalho determinar a eficácia de controle dos isolados UFV-75 e UFV-172 (identificados como *Bacillus cereus* via sequenciamento do RNA 16S no Department of Genetics – Genome Research Unit. Universitat Kaiserslautern, Alemanha) e UFV-108 (identificado como *Pseudomonas putida* via análise de ácidos graxos), pré-selecionados como agentes de biocontrole de doenças de parte aérea da cultura (artigo 1), em função do tipo de patógeno desafiante da cultivar utilizada e da idade da plantas.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos em casas de vegetação e no Laboratório de Bacteriologia e Controle Biológico do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

### **Ensaio de efetividade de agentes de biocontrole contra patógenos causadores de doenças foliares do feijoeiro.**

Neste ensaio sementes de feijoeiro, cultivar Pérola, foram plantadas em copos plásticos de 300 mL, contendo solo estéril, com composição das frações de areia, argila e esterco em 2:2:1.

Os isolados a serem aplicadas nas plantas foram repicados para placas de Petri com meio 523 (Kado& Heskett, 1970). Após 24h, as suspensões de células, foram preparadas adicionando-se água filtrada não esterilizada e raspando-se as colônias formadas com uma alça de Drigalski. As suspensões de

células foram ajustadas, com auxílio de um espectrofotômetro a uma densidade óptica de 0,4 (OD<sub>540</sub> nm).

Os patógenos desafiantes usados no ensaio foram: *Pseudomonas viridiflava*, *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. (Zaum. & Thom.), *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferr., *Erysiphe polygoni* D.C., pertencentes à coleção de culturas do Departamento de Fitopatologia

Para a inoculação dos patógenos, os mesmos foram primeiramente repicados em meio BDA (Tuite, 1969) e mantido em incubadora, a 25°C, até terem produzido abundante esporulação. Suspensões de esporos dos patógenos fúngicos foram preparadas a partir de raspagem com alça de Drigalski e adição de água filtrada não esterilizada ao meio de cultura. Estas suspensões foram filtradas em gaze hidrofílica e, a concentração foi ajustada em câmara de Newbauer (Dhingra & Sinclair, 1995) a  $8,5 \times 10^5$  esporos/mL, para *Colletotrichum lindemuthianum* e,  $1,0 \times 10^5$  esporos/mL para *Phaeoisariopsis griseola*.

Para a preparação de suspensão de esporos de *Erysiphe polygoni*, folhas de feijoeiro cultivar Pérola, contendo crescimento micelial do fungo foram pinceladas e os esporos recolhidos em vidro de relógio. Estes esporos foram suspensos em solução salina 0,85% não esterilizada. A concentração foi ajustada a  $1,5 \times 10^5$  esporos/mL em câmara de Newbauer.

Para a preparação da suspensão de células de *Pseudomonas viridiflava*, células do isolado foram repicadas para placas de Petri com meio 523. Estas foram mantidas em câmara B.O.D. 24 h, a 28°C. A suspensão de células foi preparada pela raspagem das colônias com auxílio de uma alça de Drigalski, com adição de solução salina 0,85% não esterilizada e foi ajustada a uma densidade óptica de 0,2 (OD<sub>540</sub> nm) (Romeiro, 2000).

Aos trinta dias após a emergência das plantas, o ensaio foi realizado para cada patógeno com os seguintes tratamentos: i) plantas pulverizadas com o isolado e em seguida inoculadas com o patógeno; ii) plantas pulverizadas com o fungicida específico para cada patógeno e em seguida inoculadas com o patógeno (controle) e; iii) plantas não pulverizadas com o isolado e inoculadas com o patógeno (testemunha). As plantas pulverizadas com o isolado foram

mantidas em casa de vegetação em seguida inoculadas com o patógeno desafiante

Os fungicidas utilizados foram: bravonil 750 PM (3,5 g/L), para o controle da mancha angular e para o controle da antracnose; cupravit azul Br (10 g/L), para o controle da mancha bacteriana; kumulus DF (0,6 g/L), para o controle do oídio.

As plantas foram pulverizadas com os isolados e mantidas em casa de vegetação por quatro dias. Após esse intervalo de tempo, os patógenos foram inoculados, utilizando-se pulverizador manual. As plantas inoculadas foram levadas para câmara de nevoeiro por 24h, a 25° C. Em seguida, foram transferidas para a casa de vegetação, onde se aguardou o surgimento dos primeiros sintomas.

A avaliação da severidade das doenças foi feita por meio de contagem de lesões por centímetro quadrado, para *Phaeoisariopsis griseola* e *Pseudomonas viridiflava* e por meio de determinação da área foliar lesionada, para *Colletotrichum lindemuthianum* e *Erysiphe polygoni*, a partir das escalas diagramáticas desenvolvidas por Godoy *et al.*, (1997).

O delineamento experimental foi de plantas ao acaso, com 10 plantas por tratamento.

### **Ensaio de efetividade de controle do cretamento bacteriano em função da cultivar**

Sementes de feijoeiro, das cultivares Diamante Negro, Manteigão, Meia-Noite, Ouro Negro, Pérola, Radiante, Valente, Vermelhinho e Talismã, foram plantadas em copos plásticos de 300 mL, contendo solo estéril, com composição das frações de areia, argila e esterco em 2:2:1.

Os isolados a serem aplicadas nas plantas foram repicados para placas de Petri com meio 523 (Kado& Heskett, 1970). Após 24h, as suspensões de células, foram preparadas adicionando-se água filtrada não esterilizada e raspando-se as colônias formadas com uma alça de Drigalski. As suspensões de células foram ajustadas, com auxílio de um espectrofotômetro a uma densidade óptica de 0,4 (OD<sub>540</sub> nm).

Para a preparação da suspensão de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*., células do isolado foram repicadas para placas de Petri com meio

523. Estas foram mantidas em câmara B.O.D. 24 h, a 28°C. A suspensão de células foi preparada pela raspagem das colônias com auxílio de uma alça de Drigalski, com adição de solução salina 0,85% não esterilizada e foi ajustada a uma densidade óptica de 0,2 (OD<sub>540</sub> nm) (Romeiro, 2000).

Aos trinta dias após a emergência das plantas, o ensaio foi realizado para cada cultivar com os seguintes tratamentos: i) plantas pulverizadas com o isolado e em seguida inoculadas com o patógeno; ii) plantas pulverizadas com o fungicida cupravit azul Br (10,0 g/L) e em seguida inoculadas com o patógeno (controle) e; iii) plantas não pulverizadas com o isolado e inoculadas com o patógeno (testemunha). As plantas pulverizadas com o isolado foram mantidas em casa de vegetação em seguida inoculadas com o patógeno desafiante

As plantas foram pulverizadas com os isolados e mantidas em casa de vegetação por quatro dias. Após esse intervalo de tempo, o patógeno foi inoculado, utilizando-se pulverizador manual. A avaliação da severidade foi feita pela contagem do número de lesões por centímetro quadrado.

O delineamento experimental foi de plantas ao acaso, com 10 plantas por tratamento.

#### **Ensaio de amplitude controle em função da idade das plantas.**

Neste ensaio, sementes de feijoeiro, cultivar Pérola, foram plantadas em vasos de 5L, em solo estéril, com composição das frações de areia, argila e esterco em 2: 2:1, em intervalos constantes de 10 dias, durante 70 dias.

Para a preparação da suspensão de células de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, células do isolado foram repicadas para placas de Petri com meio 523. Estas foram mantidas em câmara B.O.D. 24 h, a 28°C. A suspensão de células foi preparada pela raspagem das colônias com auxílio de uma alça de Drigalski, com adição de solução salina 0,85% não esterilizada e foi ajustada a uma densidade óptica de 0,2 (OD<sub>540</sub> nm) (Romeiro, 2000).

Para cada grupo de plantas com idades variando de 10 a 80 dias após a germinação o ensaio foi realizado com os seguintes tratamentos: i) plantas pulverizadas com o isolado e em seguida inoculadas com o patógeno; ii) plantas pulverizadas com o fungicida cupravit azul Br (10,0 g/L) e em seguida inoculadas com o patógeno (controle) e; iii) plantas não pulverizadas com o isolado e inoculadas com o patógeno (testemunha).

As plantas foram pulverizadas com os isolados e mantidas em casa de vegetação por quatro dias. Após esse intervalo de tempo, o patógeno foi inoculado, utilizando-se pulverizador manual. As plantas inoculadas foram levadas à câmara de nevoeiro, por 24h a 25°C e, em seguida, novamente levadas para casa de vegetação, onde aguardou-se o surgimento dos primeiros sintomas. A avaliação da severidade foi feita pela contagem do número de lesões por centímetro quadrado.

O delineamento experimental foi de plantas ao acaso, com 10 plantas por tratamento.

#### **Análise de dados**

A análise estatística dos ensaios foi realizada por meio do programa Statistica®, versão 6.0 e, utilizou-se como teste de média o teste de Tukey a 5% de significância.

## **RESULTADOS**

### **Ensaio de efetividade de agentes de biocontrole contra patógenos causadores de doenças foliares do feijoeiro.**

Em todos os testes, os três isolados tiveram desempenho superior à testemunha.

Entre os isolados testados, UFV-172 foi o que proporcionou melhores resultados. Se comparado com a testemunha, UFV-172 reduziu a severidade da mancha angular em 58,6% (Figura 1), reduziu a severidade da mancha bacteriana em 93,7% (Figura 2), reduziu a severidade do oídio em 66,7% (Figura 3) e reduziu a severidade da antracnose em 76,5% (Figura 4). Os isolados UFV-75 e UFV-108 também apresentaram desempenho ou superior ou semelhante aos fungicidas usados como controles, em todos os testes.

### **Ensaio de amplitude controle em função da idade das plantas.**

Neste ensaio, a efetividade de controle do cretamento bacteriano pelos isolados foi alterada pela idade das plantas. Nos testes com plantas com idades superiores a 70 dias após a emergência, não houve diferença significativa entre os isolados testados e a testemunha com água. Nas outras idades, todos os

isolados reduziram a severidade da doença quando comparados com a testemunha com água (Figuras 5, 6 e 7).

Nesse ensaio, novamente os isolados foram mais eficazes em reduzir a severidade que o fungicida usado, no caso o cupravit Azul Br, exceto quando as plantas tinham 10 dias após a emergência.

Observou-se também que mesmo o isolado de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* teve dificuldade infectar as plantas com idades de 80 dias após a emergência. É possível afirmar isso, pela comparação da severidade da doença entre o 10º e o 70º dias após a emergência com a severidade da doença aos 80 dias após a emergência, nos três ensaios com os diferentes isolados.

#### **Ensaio de efetividade de controle do cretamento bacteriano em função da cultivar**

Os três isolados testados foram capazes de controlar o cretamento bacteriano, independentemente da cultivar utilizada.

Dentre as cultivares testadas, ‘Valente’ e ‘Pérola’ foram as que os isolados conseguiram o melhor controle, independentemente do isolado de residente de filoplano testado. E as cultivares Ouro Negro, Diamante Negro e Meia-Noite, aquelas em que os isolados tiveram pior desempenho, independentemente do isolado testado (Figuras 8, 9 e 10).

## **DISCUSSÃO**

Embora alguns autores tenham sugerido a eficácia do controle biológico de doenças de plantas poderia ser afetada em função das diferentes características físicas, bioquímicas e da própria composição dos nutrientes disponíveis na superfície do filoplano (Beattie & Lindow, 1995; Beattie & Lindow, 1999; Leben, 1981; Lindow e Brandl, 2003), isso não foi observado nos ensaios realizados neste trabalho. Pelo contrário. Os resultados obtidos confirmaram resultados de trabalhos anteriores com os isolados UFV-75, UFV-108 e UFV-172 (artigos 1 e 3).

Possivelmente, a ausência de efeito significativo quanto a cultivar utilizada, pode estar relacionado com a própria natureza dos isolados. UFV-75 e

UFV-172 foram identificados como uma espécie do gênero *Bacillus* (*B. cereus*). Este gênero compreende um grupo de bactérias bastante heterogêneo, o qual já foi descrito nos mais diferentes habitats, entre eles, a rizosfera e o filoplano das mais diferentes plantas cultivadas (Allen *et al.*, 1983; Ercolani, 1978; Morris *et al.*, 1982; Halfeld-Vieira, 2002), além de muitas espécies terem sido relatadas como agentes de biocontrole de diversas doenças de plantas, inclusive a própria espécie *B. cereus* (Halfeld-Vieira, 2002, Halfeld-Vieira *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004). Adicionalmente, bactérias do gênero *Bacillus* são produtoras de endósporos, o que favorece a sobrevivência nas mais diferentes condições de ambiente, sendo tolerantes à dessecação, radiação ultra-violeta, além de produzir uma ampla gama produtos tóxicos, com atividade antimicrobiana (Morris *et al.*, 1982). Quanto ao fator nutricional, Allen *et al.*, (1983) relata que as espécies do gênero *Bacillus* são capazes de utilizar diferentes fontes de carbono e nitrogênio, o que explica a capacidade dessa bactéria colonizar diferentes habitats

Já o isolado UFV-108 trata-se de uma espécie do gênero *Pseudomonas* (*P. putida*). Bactérias desse gênero têm sido relatadas como eficientes colonizadoras da filoplano em diferentes espécies de plantas, pela capacidade de utilizar uma ampla gama de nutrientes e serem capazes de habitar diferentes nichos de sobrevivência na superfície das folhas (Hirano e Upper, 2000).

Em relação à eficácia dos isolados em função da idade das plantas, a ineficácia dos isolados em controlar o crescimento bacteriano em folhas velhas pode estar relacionado a presença de compostos tóxicos, como fenóis, que são liberados pelos tecidos a medida que estes entram e fase de senescência. Ademais, existe a possibilidade dos isolados estarem competindo com outros microrganismos pelos nutrientes disponíveis. Segundo Morris *et al.*, (1982) em folhas mais jovens, bactérias de feijoeiro utilizavam-se somente de poucas fontes de carbono e nitrogênio e, que à medida que as folhas envelheciam, essas fontes aumentavam em quantidade e diversidade, aumentando a diversidade populacional de bactérias e de outros microrganismos e, conseqüentemente a antibiose entre eles.

Ao que tudo indica, a disponibilidade de nutrientes parece aumentar à medida que o tecido da planta vai envelhecendo, até um determinado ponto

onde a sucessão ecológica afeta microrganismos mais simples, como bactérias, em favor dos mais complexos, como fungos, capazes de explorar mais eficientemente o tecido em senescência (Windels & Lindow, 1985; Deacon, 1997; Lindow & Brandl, 2003).

O fator idade da planta afetou inclusive *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli*. A bactéria teve dificuldade para infectar o tecido senescente. O fenômeno é facilmente observado, pois a severidade da doença foi reduzida a praticamente a metade, nas folhas com oitenta dias após a emergência. Novamente, a presença de compostos tóxicos liberados no tecido e a baixa disponibilidade de nutrientes para a multiplicação da bactéria podem ter sido os fatores que influenciaram na baixa severidade da doença

Quanto aos ensaios de efetividade de agentes de biocontrole contra patógenos causadores de doenças foliares do feijoeiro, foi possível confirmar que os isolados UFV-75, UFV-108 e UFV-172 apresentam uma característica bastante desejável, que é amplitude de controle de doenças. Esses isolados já haviam sido testados em nível de campo em duas épocas diferentes e sob dois cultivares diferentes, contra dois dos mais importantes patógenos da cultura: *Uromyces appendiculatus* (Pers) Unger e *Phaeoisariopsis griseola*, apresentando resultados de controle bastante satisfatórios (artigo 3). Nos ensaios realizados em casa de vegetação, os isolados foram capazes de controlar eficientemente todos os patógenos (artigos 1 e 2).

Os resultados do ensaio de efetividade de biocontrole de patógenos servem para corroborar ainda mais a eficiência dos isolados em controlar doenças da cultura do feijoeiro e demonstram a potencialidade dos isolados em serem utilizados em futuras formulações comerciais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. A.; AUSTIN, B. & COLWELL, R.R. Numerical taxonomy of bacterial isolates associated with a fresh water fishery. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p.2043-2062, 1983.
- ANDREWS, J.H.; HIRANO, S. S. (ed.) **Microbial Ecology of Leaves**, Springer-Verlag: New York, 1991.499p.

- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v. 33, p. 145-172, 1995.
- BEATTIE, G.A.; LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, p. 353-359, 1999.
- DEACON, J.W. **Modern Mycology**, 3 ed., Blackwell Science: Cambridge, 1997. 303p.
- DHINGRA, O. D.& SINCLAIR, J. B. **Basic Plant Pathology Methods**, Boca Raton, CRC Press, 1995, 355p.
- ERCOLANI, G.L. *Pseudomonas savastanoi* and other bacteria colonizing the surface of olive leaves in the field. **Journal of General Microbiology**, v.109, p.245-257, 1978.
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations- Agricultural Database. In: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>, (último acesso em 11 de Abril de 2005). 2005.
- GODOY, C. V.; CARNEIRO, S. M.T. P. G.; IAMUTI, M. T.; PRIA, M.D.; AMORIM, L.; BERGER, R. D. & BERGAMIM FILHO, A. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.104, n.4, p.336-345, 1997.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Tese (Doutorado), 98p, 2002.
- HALL, R. (Ed.). **Compendium of Bean Diseases**, St. Paul, APS Press, 1991. 73p.
- HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and ephiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 624-653, 2000.
- JACOB, C. Epiphytic bacteria in relation to pesticides applied on tomato plants. **International Congress on Plastics in Agriculture**. 14, p. 155-157, 1997.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969 – 979, 1970.
- KINKLE, L.L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.

- LEBEN, C. How plant-pathogenic bacteria survive. **Plant Disease**, v. 65, n. 8, p. 633-637, 1981
- LINDOW, S. E. & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.4, p. 1875-1883, 2003.
- MORRIS, C.E. Diversity of epiphytic bacterial communities on bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves and pods based on nutrient utilization. **Phytopathology**, v. 72, n. 7, p. 936, 1982. (Abstracts.)
- PAULA-JÚNIOR, T. J. & ZAMBOLIM, L. Doenças. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J. & BORÉM, A. (ed.). **Feijão Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa, Editora UFV, 1998. p.375-432.
- RAMALHO M. A. P. & ABREU, A. F. B. Cultivares In: VIEIRA C.; PAULA Jr, T. J. & BORÉM, A. (ed.). **Feijão. Aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**, Viçosa, Editora UFV, 1998, 596p.
- ROMEIRO, R. S.; **Bactérias fitopatogênicas**, Viçosa, Imprensa. Universitária, 2000, 283p.
- ROMEIRO, R.S.; NEVES, D. M. S. CARVALHO, M. G. & CARRER-FILHO, R. Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. **Summa Phytopathologica**, v. 26, p. 220-224, 2000.
- SARTORATO, A.& RAVA, C. A. **Principais doenças e pragas do feijão comum e o seu controle** (ed.) Goiânia; EMBRAPA-CNPAF, 1994, 290p.
- TUITE, J. **Plant Pathological Methods**, Minneapolis, Burgess Publisher Co., 1969, 239p.
- VALE F. X. R. & ZAMBOLIM, L. (Ed.), **Controle de Doenças de Plantas : grandes culturas**, Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia, vol. 1, 1997, 554p.
- WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. **Biological control on the phylloplane**, APS: St. Paul. 1985. 169 p.
- ZAMBOLIM, L. (ed.). **Manejo Integrado-Fitossanidade: cultivo protegido, pivô central e plantio direto**, Viçosa, Depto. de Fitopatologia, 2001.722p.
- ZIMMERMANN, M. J. O.; CARNEIRO, J. E. S; DEL PELOSO, M. J.; COSTA, J. G. C.; RAVA, C. A.; SARTORATO, A. & PEREIRA, P. A. A. Melhoramento genético e cultivares. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F. & ZIMMERMANN, M. J.O. (ed.) **Cultura do Feijoeiro no Brasil**, Piracicaba, Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo, 1996, 786p.

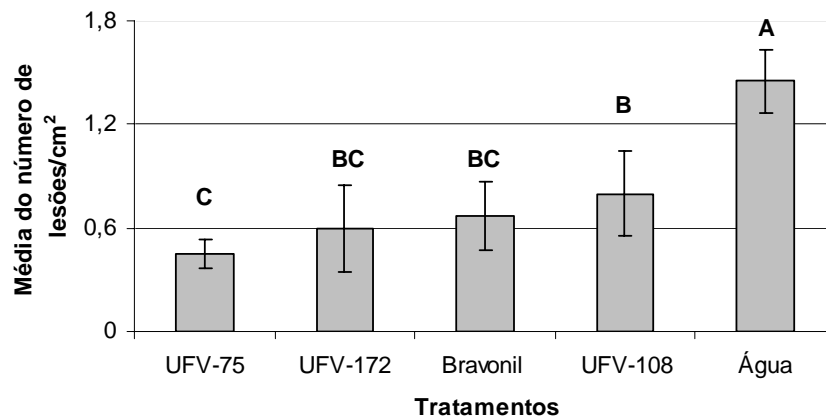


Figura 1-Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro, cultivar Pérola, causadas por *Phaeoisariopsis griseola*, previamente expostas aos isolados de procariotas residentes de filoplano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

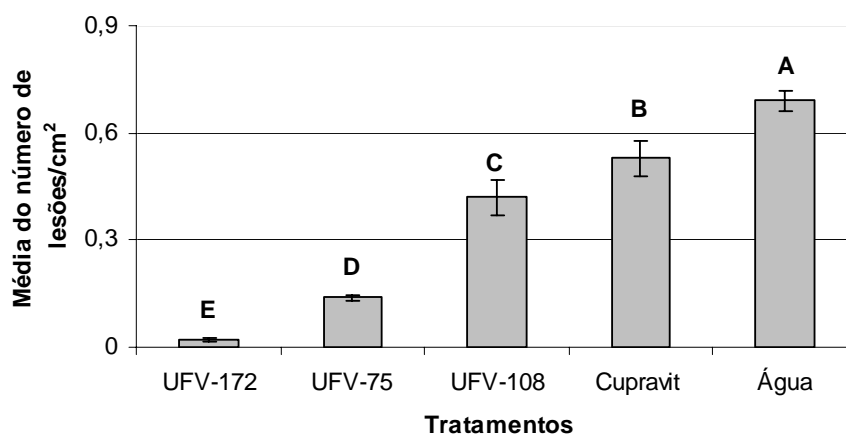


Figura 2- Média de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro, cultivar Pérola, causadas por *Pseudomonas viridiflava*, previamente expostas aos isolados de procariotas residentes de filoplano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

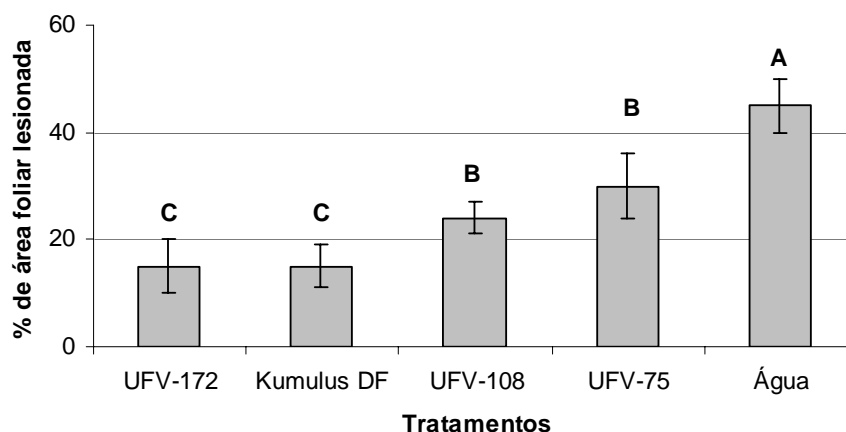


Figura 3- Porcentagem da área foliar lesionada de folhas feijoeiro cultivar Pérola por *Erysiphe polygoni* em plantas previamente expostas aos isolados de procariotas residentes de filoplano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

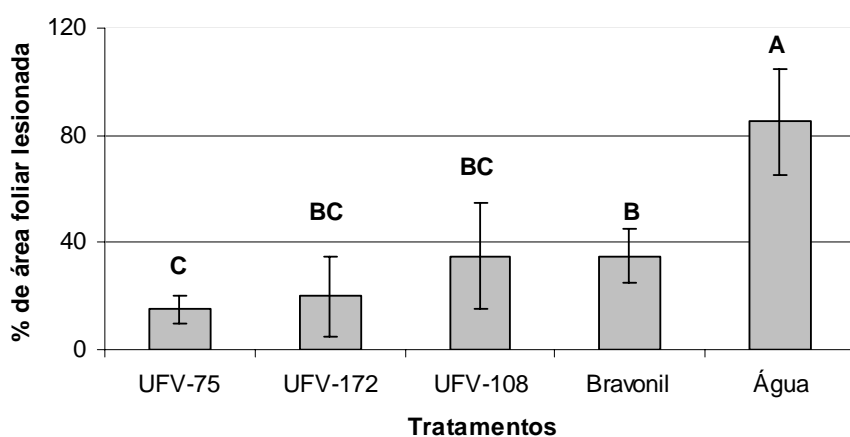


Figura 4- Porcentagem da área foliar lesionada em folhas feijoeiro cultivar Pérola por *Colletotrichum lindemuthianum* em plantas previamente expostas aos isolados de procariotas residentes de filoplano. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

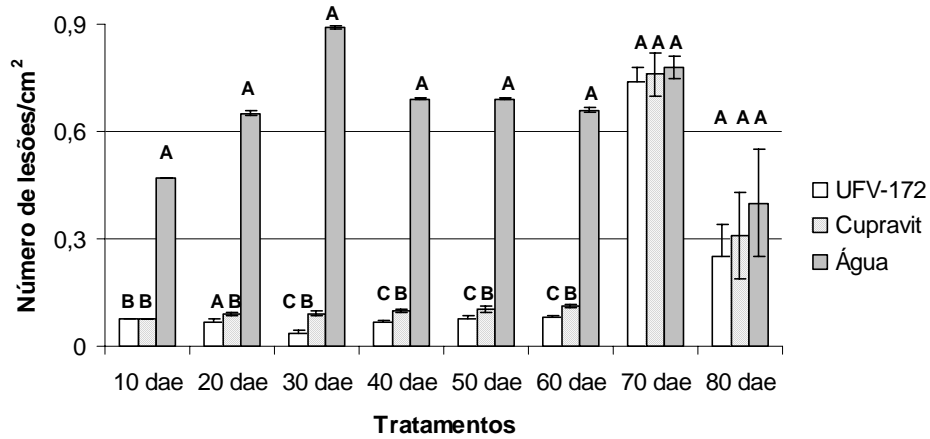


Figura 5-Número de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro, cultivar Pérola, causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas com diferentes idades previamente expostas ao isolado UFV-172. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

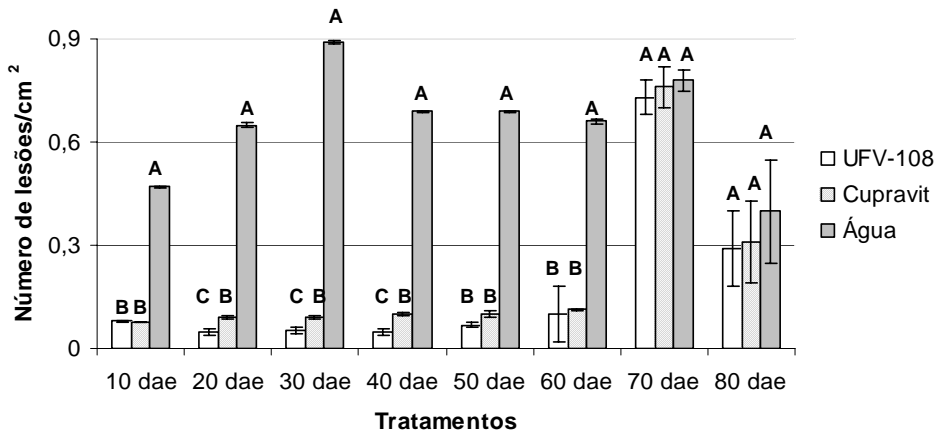


Figura 6-Número de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro, cultivar Pérola, causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas com diferentes idades previamente expostas ao isolado UFV-108. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

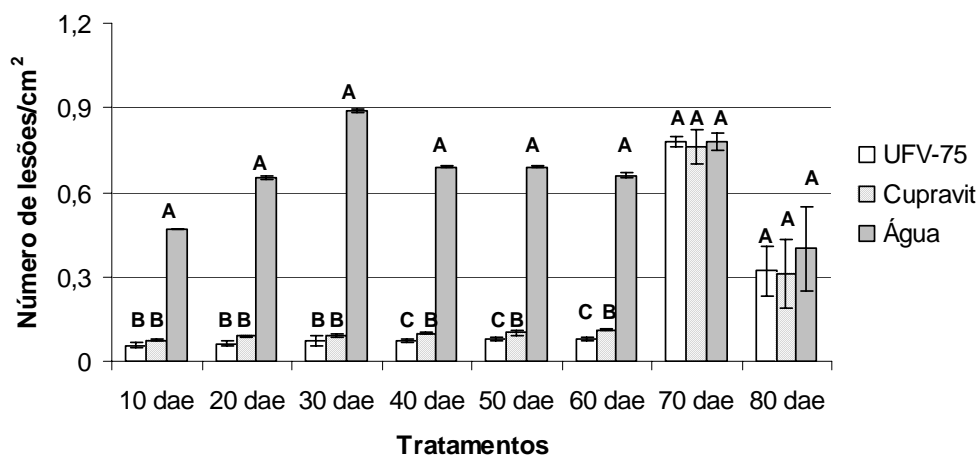


Figura 7- Número de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro, cultivar Pérola, causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em plantas com diferentes idades previamente expostas ao isolado UFV-75. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

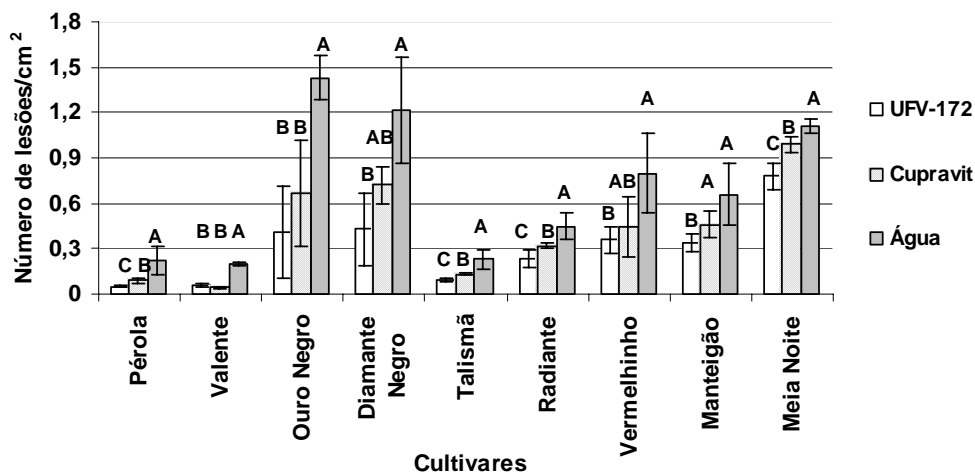


Figura 8- Número de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro em diferentes cultivares causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* em plantas previamente expostas ao isolado UFV-172. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

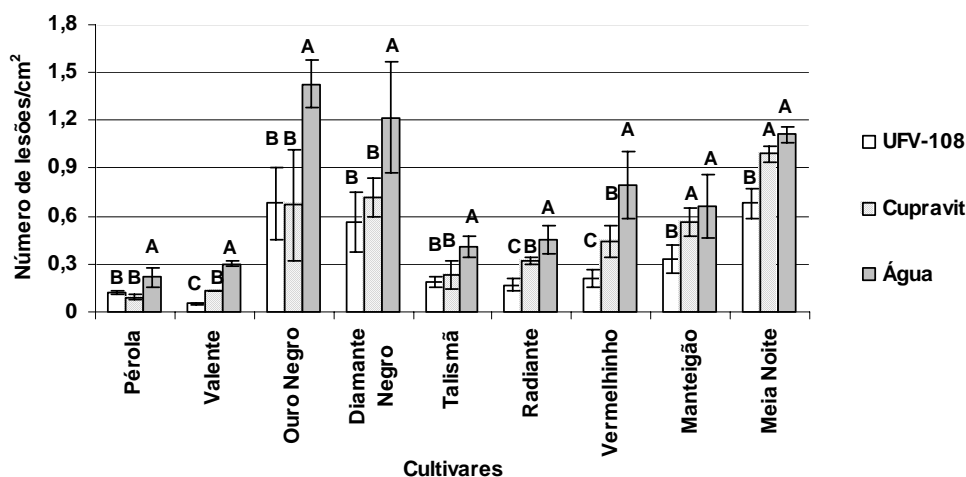


Figura 9- Número de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro em diferentes cultivares causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* em plantas previamente expostas ao isolado UFV-108. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

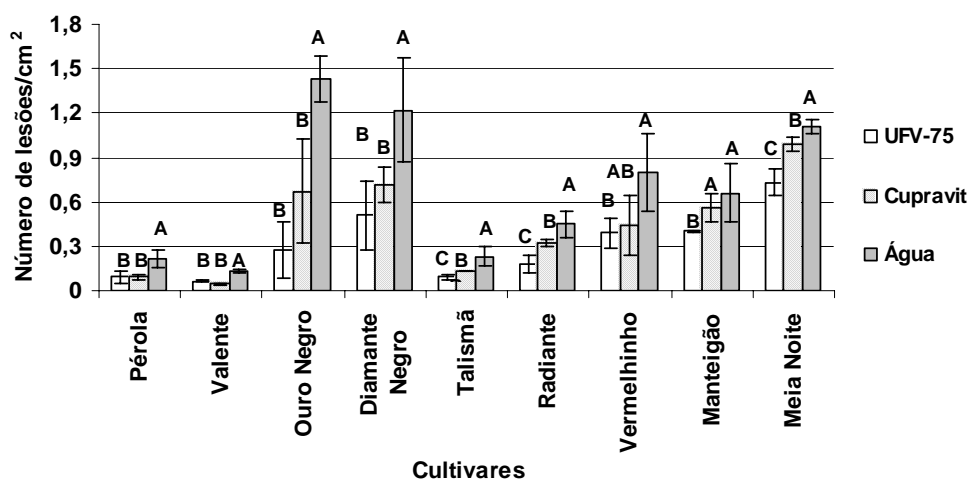


Figura 10 Número de lesões por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro em diferentes cultivares causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* em plantas previamente expostas ao isolado UFV-75. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

## ARTIGO 7

### SISTEMICIDADE DE RESPOSTA A DOENÇAS COMO INDÍCIO DA ELEVAÇÃO DE PLANTAS DE FEIJOEIRO AO ESTADO DE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

#### RESUMO

O isolado UFV-172 (*Bacillus cereus*), uma bactéria residente de filoplano, obtida de feijoeiros sadios e previamente selecionada como agente de biocontrole de doenças da parte aérea da cultura, foi investigado quanto a sua potencialidade de promover o controle de doenças via indução de resistência, uma vez que não demonstrou ter ação direta sobre múltiplos patógenos. No primeiro ensaio, plantas de feijoeiro com 40 dias de idade da cultivar Ouro Negro tiveram seus pares de folhas superiores ou inferiores pulverizados com o antagonista (suspensão de suspensão de células ajustadas numa densidade óptica de 0,4 (OD<sub>540nm</sub>). Quatro dias depois, as folhas pulverizadas foram removidas e o patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap) foi inoculado, via pulverização de uma suspensão de células (OD<sub>540nm</sub>=0,2) nos pares de folhas acima e abaixo das que foram removidas. A severidade da doença foi quantificada via contagem de lesões. No segundo ensaio, usando as mesmas plantas do primeiro, as folhas remanescentes foram removidas e imersas e solução salina (0,85% NaCl), e mantidas sob agitação contínua por 4 horas e, a partir do sobrenadante, fez-se uma diluição serial em placas de Petri contendo meio de isolamento bacteriano padrão, a fim de estimar-se uma eventual flutuação populacional dos procariotas residentes de filoplano nas folhas. O terceiro ensaio, constitui-se de pulverização de plantas de feijoeiro cv Pérola com 21 dias de idade (conforme anteriormente descrito) e, após 15 dias, uma suspensão de ovos de *Meloidogyne incognita* (Mi, 5000 ovos/planta) foi inoculada no solo e, após 90 dias, realizou-se a avaliação, quantificando-se o número de ovos/grama de raiz, o peso do sistema radicular e ainda, o número de nódulos de rizóbio/grama de raiz. Um indicio de sistemicidade de proteção foi observado, pois, os pares de folha acima e abaixo das que foram

pulverizadas com o antagonista apresentaram menor severidade de doença que as folhas nos tratamentos controles. Outra indicação de sistemicidade está relacionada à observação do decréscimo no número de ovos de *Mi* por grama de raiz, em consequência da aplicação anterior do antagonista no filoplano. Não se observou alteração significativa nem na nodulação do simbiote, nem na população total de procariotas na superfície das plantas, indicando que não houve efeito deletério aos organismos benéficos ou neutros associados às plantas.

### ABSTRACT

Isolate UFV-172 (*Bacillus cereus*), a phylloplane resident obtained from healthy bean plants and previously selected as good biocontrol agent for foliar diseases of common bean was investigated for its effectiveness for promoting control as resistance inducer since it did not show any direct activity against multiple pathogens. In a first approach, 40 days old bean plants ('Ouro Negro') had leaf pairs (upper or down ones) tentatively colonized with the antagonist (spray, cell suspension,  $OD_{540nm}=0,4$ ). Four days after, the sprayed leaf pair was removed and the challenging pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) was inoculated (spray, cell suspension,  $OD_{540nm}=0,2$ ) in leaf pairs above or bellow the removed one and disease severity quantified by lesion counting. In a second approach, using the same plants of the first one, remaining leaves were excised, imersed in saline (0,85% NaCl), kept under continuous shaking for 4 hours and the liquid fase serially diluted and plated in standard culture media for estimating eventual fluctuations in the total population of resident prokaryotes in leaves. The third approach consisted in delivering the antagonist to 21 days old bean plants as previously described and, after 15 days, an egg suspension of *Meloidogyne incognita* (*Mi*, 5000 eggs/plant) was inoculated to the soil, being the evaluation performed after 90 days, by counting eggs/gram of root and root system weight. Simultaneously, in the same experiment, nodules of rhizobia symbionts were counted, too. An indication of sistemicity of protection was observed in the sense that leaf pairs either above or bellow the inoculated and later excised ones showed less disease than the controls. Another indication of

sistemicity is linked to the observation that a decrease in the number of eggs (Mi) took place as a consequence of delivery of the antagonist to the phylloplane. No significant alterations were observed either on symbiont nodulation or in the total population of prokaryotes onto the leaf surface. This results indicate which was no deleterial effects against beneficial or neutral organisms associated with plant

## INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, esforços têm sido despendidos na busca de métodos alternativos ao controle químico, pois este, além de causar prejuízos ao ambiente, causa danos diretos à saúde humana (Campanhola e Bettioli, 2003).

Entre as medidas alternativas de controle de doenças de plantas, a linha de pesquisa voltada para o uso de agentes indutores de resistência a doenças tem sido explorada, na busca de novos agentes indutores e do entendimento dos processos que ocorrem durante o fenômeno (Pieterse *et al.*, 2000; Resende *et al.* 2002; Romeiro, 1999; Romeiro *et al.*, 2005; Sticher, 1997). A indução de resistência consiste no aumento do nível de resistência, sem qualquer alteração no genoma da planta, por meio da utilização de agentes, chamados indutores ou eliciadores (Stadnik, 2000).

Os primeiros relatos sobre o fenômeno da indução de resistência datam de 1901 (Kessman *et al.* 1994). Experimentos realizados por Ray & Beauverie em tubérculos de batata, inoculados com uma raça virulenta de *Phytophthora infestans*, que aparentemente protegiam os tecidos contra a infecção por uma raça virulenta. Em outro trabalho, Ross (1961) demonstrou que, ao inocular plantas de fumo com TMV, elas ficavam protegidas contra outros patógenos.

Foi demonstrado que a resistência pode ser induzida por agentes bióticos ou abióticos. Dentre os eliciadores bióticos, as rizobactérias merecem destaque. Romeiro & Kimura (1997), utilizaram rizobactérias isoladas de tomateiro sadio e verificaram que, plantas cujas sementes haviam sido embebidas em suspensão dessas bactérias, ficavam protegidas contra o patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Silva *et al.* (2004) demonstraram que um isolado de *Bacillus cereus*

induziu resistência em plantas de tomateiro a diferentes patógenos foliares, em campo, a partir de sementes microbiolizadas com suspensão do isolado.

O fenômeno de indução de resistência tem sido correlacionado diretamente à síntese de enzimas importantes em diferentes rotas metabólicas associadas aos mecanismos de defesa, como peroxidases, lipoxigenases, glucanases, quitinases, etc. Silva (2002) comprovou que, quando sementes de tomateiro eram microbiolizadas com suspensão de células de *Bacillus cereus*, enzimas envolvidas na ativação do estado de indução eram sintetizadas pela planta e atuavam na redução da severidade de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

No entanto, há poucos trabalhos que demonstram que a ativação do estado de indução também ocorra com plantas pulverizadas com bactérias residentes de filoplano.

Halfeld-Vieira (2002) obteve de filosfera de tomateiro 300 isolados bacterianos, que foram testados para o controle de doenças de parte aérea da cultura. Deles, o isolado UFV-IEA-6, não apresentou ação direta sobre os patógenos, embora tenha reduzido a severidade dos mesmos em casa de vegetação e campo. Em ensaios enzimáticos, o autor comprovou que o isolado induzia as plantas à síntese de enzimas envolvidas na ativação do estado de indução. Ekici & Yuen, (2004) também demonstraram esse efeito em plantas de *Festuca aurundinacea*, com a aplicação de um isolado de *Lysobacter enzymogenes*. Eles verificaram que, após a aplicação do isolado, as plantas exibiam a síntese de peroxidases e tornavam-se resistentes ao patógeno *Bipolaris sorokiniana*.

Porém, quando plantas são expostas a agentes bióticos e abióticos, putativamente indutores de resistência, e ficam protegidas, isso não significa que a indução tenha ocorrido, pois segundo outros autores, o agente tanto pode estar induzindo resistência como pode estar atuando diretamente sobre o patógeno, ou ambos ao mesmo tempo (Romeiro, 2002). A fim de dirimir dúvidas de que um agente é ou não realmente indutor de resistência, Steiner & Schönbeck (1995) estabeleceram critérios para confirmar a real ocorrência de indução de resistência: ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno desafiante; intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e

a expressão da resistência; ausência de magnitude de expressão de resistência, em função do aumento de concentração do indutor aplicado; inespecificidade de proteção; resistência local e sistêmica e; ser a resistência dependente do genótipo do hospedeiro.

O principal problema em determinar se um microrganismo do filoplano é indutor de resistência, trata-se da ausência de separação dos componentes microbianos da interação. Normalmente, os microrganismos testados são rizobactérias e os patógenos são foliares. No caso de procariotas residentes de filoplano, ambos encontram-se no mesmo sítio de interação.

Na busca de demonstrar que um isolado de *Bacillus cereus*, obtido de filoplano de tomateiros saudáveis, seria indutor de resistência, Vieira Júnior *et al.* (2005) pulverizaram uma suspensão do isolado, num par de folhas de tomateiros protegidas por uma sacola plástica, no terço inferior e no superior da copa da planta. Após quatro dias, as folhas pulverizadas foram arrancadas e o patógeno *P. syringae* pv *tomato* foi inoculado em duas folhas acima ou abaixo das pulverizadas com o putativo indutor. Ao se quantificar a doença, os autores observaram redução na severidade da mesma, tanto no terço inferior como no superior, em relação a plantas não tratadas.

Com base nestas informações, objetivou-se neste trabalho, determinar se um isolado de procariota residente de filoplano, selecionado como agente de biocontrole de doenças da parte aérea do feijoeiro, poderia estar atuando como um indutor de resistência sistêmica, contra os patógenos desafiantes *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1987) Vauterin, Hoste Kersters & Swings 1995 e *Meloidogyne incognita*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Ensaio de sistemicidade de resposta de indução ao crestamento bacteriano comum**

Sementes de feijoeiro, cultivar Ouro Negro, foram plantadas em vasos plásticos de 5L de capacidade, em solo esterilizado, com a proporção de areia, argila e esterco de 2: 2:1.

Aos 40 dias após a emergência, um grupo de 10 plantas foi pulverizado na primeira folha trifoliolada, e outro grupo de 10 plantas foi pulverizado na terceira folha trifoliolada, com uma suspensão de células do isolado UFV-172 (previamente identificado como *Bacillus cereus*, por análise de RNA 16S-Department of Genetics – Genome Research Unit. Universitat Kaiserslautern, Alemanha). Essa suspensão foi preparada a partir de placas de Petri com meio 523 (Kado e Heskett, 1970) com células do isolado repicadas 24h antes e incubadas a 25°C. A densidade óptica da suspensão foi ajustada a 0,5 de absorbância (OD<sub>540 nm</sub>). Na testemunha, pulverizou-se água nas folhas. Durante o intervalo de tempo entre a pulverização até a remoção das folhas, essas foram mantidas cobertas por uma sacola plástica transparente.

Quatro dias após a pulverização com isolado UFV-172, as folhas pulverizadas foram arrancadas e as plantas levadas para câmara de nevoeiro. Inoculou-se uma suspensão de células de *X. axonopodis pv. phaseoli* (OD<sub>540nm</sub>= 0,2), a qual foi preparada de forma semelhante a da suspensão do antagonista, como já descrito. As plantas foram mantidas na câmara de nevoeiro a 25°C, por 24h, e levadas para câmara de crescimento, com temperatura controlada a 26°C. Com o surgimento dos primeiros sintomas, quantificou-se o número de lesões nas folhas por centímetro quadrado.

#### **Determinação da supressividade de populações epifíticas de folhas de feijoeiro**

Folhas de feijoeiro de plantas tratadas e não-tratadas no ensaio anterior foram colhidas, após quatro dias da inoculação com o putativo agente indutor. Promoveu-se a pesagem das folhas e a extração da microflora epifítica por meio de imersão das folhas em frascos tipo Erlenmeyers, com solução salina 0,85% esterilizada, sob agitação constante, a 100rpm, por 4 horas. Uma alíquota de 100µL foi tomada, procedendo diluição seriada em placas (Romeiro, 2001), com meio 523 sólido (Kado & Heskett, 1970).

As placas foram mantidas em incubadora, a 28°C, por 24 h e, após esse período, a microflora epifítica total foi quantificada, por meio da contagem do número de unidades formadoras de colônia/ grama de folha.

#### **Ensaio de resistência sistêmica induzida contra *M. incognita***

Sementes de feijoeiro, cultivar Pérola foram plantadas em 32 vasos plásticos de 5L de capacidade, em solo esterilizado, preparado na proporção de areia, argila e esterco de 2:1:1. Foram mantidas duas plantas por vaso.

Aos 21 dias após a emergência, 16 plantas de feijoeiro foram pulverizadas com a suspensão de células do antagonista, de forma semelhante ao descrito no item anterior. Aos 25 dias após a emergência, inoculou-se oito plantas de feijoeiro pulverizadas com antagonista e oito plantas não-pulverizadas, com ovos de *M. incognita*, extraídos de plantas de tomateiro, cultivar Santa Clara, segundo método descrito por Freitas *et al.* (1999). Inoculou-se uma suspensão de 10mL contendo 10000 ovos (equivalente 5000 ovos por planta), a partir de perfurações com 10 cm de profundidade, feitas com bastão de vidro no solo do vaso. As plantas foram distribuídas aleatoriamente sobre a bancada. Os tratamentos foram estes: plantas pulverizadas com UFV-172, mas não inoculadas com *M. incognita*; plantas pulverizadas com o isolado UFV-172 e inoculadas com *M. incognita*; plantas não pulverizadas e inoculadas com *M. incognita*; e plantas não-inoculadas e não-pulverizadas.

Aos sessenta dias após a inoculação (85 dias após a emergência) as plantas foram removidas e estas tiveram as raízes secas ao ar durante 6 horas e o peso destas, determinado. O número de ovos foi quantificado após a extração das galhas e massas de ovos pelo método descrito por Freitas *et al.*(1999).

#### **Determinação da supressividade de nodulação de rizóbio em raízes de plantas de feijoeiro.**

Das raízes extraídas das plantas pulverizadas e não-pulverizadas com o isolado UFV-172 do ensaio anterior, removeram-se os nódulos de rizóbio e contou-se o número de nódulos por grama de raiz.

#### **Análise de dados**

A análise estatística dos ensaios foi realizada por meio do programa Statistica®, versão 6.0, num delineamento inteiramente casualizado e utilizou-se o teste de média de Tukey a 5% de significância.

## **RESULTADOS**

Nos ensaios de sistemicidade de resposta à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, o isolado UFV-172 reduziu a severidade da doença quanto aplicado tanto nas folhas do terço inferior quanto nas folhas do terço superior, demonstrando que houve sinalização sistêmica, pois não houve diferença entre os tratamentos quanto a posição do tratamento indutor (Figura 1).

Quando aplicado nas folhas, independente da localização, a severidade do crestamento bacteriano foi reduzida em até 45%, quando comparada com a testemunha (água).

Quanto à colonização das raízes por *M. incognita*, aparentemente, o isolado também protegeu as raízes da infecção pelo nematóide, se comparado com o tratamento em que apenas se inoculou o patógeno (Figura 2).

Houve ganho significativo de peso nas raízes das plantas pulverizadas com o isolado e a seguir inoculadas com patógeno e das raízes das plantas somente pulverizadas com o isolado quando comparadas com o tratamento em que apenas se inoculou o patógeno (Figura 3).

Também, a aplicação do isolado parece não ter afetado o desenvolvimento normal da planta, pois, se compararmos o peso das raízes de plantas pulverizadas com UFV-172 e plantas sem nenhum tratamento, observa-se que não houve diferença entre estes (Figura 3).

Nos ensaios de sistemicidade de resposta, a indução de resistência não afetou a microbiota que encontra-se associadas às raízes (Figura 4).

Nos ensaios de supressividade de populações epifíticas, não houve diferença significativa entre as plantas pulverizadas com o isolado e as plantas não pulverizadas (Figura 5).

## DISCUSSÃO

Em artigos anteriores, foi demonstrado que o isolado UFV-172 seria potencialmente um agente indutor de resistência, pois se enquadrava nos critérios sugeridos por Steiner & Schönbeck (1995). Dentre os critérios, comprovou-se que: o isolado UFV-172 reduziu a severidade da ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*), do crestamento bacteriano comum (*X. a.* pv. *phaseoli*) do oídio (*Erysiphe*

*polygoni*), da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e da mancha bacteriana (*Pseudomonas viridiflava*) quando previamente pulverizado nas plantas (artigos 1, 2, 3, e 6); o isolado restringiu o crescimento de *X. a.pv. phaseoli*, no interior dos tecidos da planta quando aplicado no externamente (artigo 8); que o isolado possui amplitude de controle de doenças, já que controlou significativamente todas as doenças citadas acima; que houve um intervalo de tempo de quatro dias entre a aplicação do isolado e o efeito de controle (artigos 1 e 6) e; que o isolado não agiu diretamente sobre nenhum dos patógenos testados (artigo 2).

Ao considerarmos os resultados do ensaio de sistemicidade de resposta ao crescimento bacteriano comum, é possível inferir que um sinal sistêmico está sendo translocado a partir do sítio de contato entre a planta e UFV-172. E esse sinal independe da localização onde é pulverizado o isolado.

O sinal é translocável não só em diferentes regiões da parte aérea, mas também é translocado dela para as raízes, controlando o nematóide das galhas. Ademais, esse sinal se mantém ao longo do tempo, pois mesmo após a remoção das folhas pulverizadas o efeito de controle se manteve e se distribuiu ao longo da planta, controlando patógenos desafiantes e restringindo seu crescimento.

Dessa maneira, mais um dos critérios para caracterizar o isolado UFV-172 como indutor de resistência fica comprovado.

A indução de resistência tem sido um fenômeno bastante estudado nas últimas duas décadas, principalmente, quando se trata da indução de resistência sistêmica mediada por agentes biológicos, em especial rizobactérias (van Loon *et al.*, 1998; Romeiro, 2002; Silva, 2002; Silva 2004). No entanto, pouco tem sido os trabalhos respeito da indução a partir de organismos da filosfera, em especial de bactérias. Até o presente, apenas os trabalhos de Ekici & Yuen (2004), Halfeld-Vieira (2002) e Vieira Júnior *et al.* (2005) aventaram para a possibilidade do fenômeno também ocorrer no filoplano

Isto é um contra-senso, pois a filosfera é um ambiente amplamente colonizado pelos mais diferentes microrganismos, entre os quais estão fungos, leveduras e principalmente bactérias, que constituem o principal grupo de organismos (Beattie & Lindow 1999; Lindow & Leveau, 2002; Lindow & Brandl, 2003). Além disso, muitos dos microrganismos capazes de colonizar a

rizosfera e induzir resistência em plantas têm sido relatados sobrevivendo em sítios protegidos na filosfera, como diversas espécies de do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* (Kinkle, 1997; Hirano & Upper, 2000; Halfeld-Vieira, 2002, Silva *et al.*, 2004). Como foi mencionado anteriormente, UFV-172 é uma espécie de *Bacillus* (*B. cereus*), a mesma espécie que foi relatada induzindo resistência em plantas de tomateiro, tanto na rizosfera (Silva *et al.*, 2004) quanto filoplano (Halfeld-Vieira, 2002; Vieira-Junior *et al.* 2005) de tomateiro.

Embora não se possa afirmar categoricamente que o isolado UFV-172 é indutor de resistência em plantas de feijoeiro, pois não se realizou os ensaios de quantificação de enzimas envolvidas na ativação da indução, os resultados dos ensaios aqui apresentados, dão indícios fortes o suficiente para sugerir que o fenômeno esteja realmente ocorrendo.

Também, tem sido sugerido que os produtos da indução, como quitinases, glucanases, peroxidases, etc., podem atuar tanto sobre os organismos fitopatogênicos como sobre organismos benéficos que interagem com a planta (Purrington 2000; Tosi & Zizzerini, 2000; Heil, 2001). Mais uma vez, este fenômeno não foi observado, tanto nos ensaios de supressão da nodulação de rizóbio, quanto na supressão de microrganismos presentes na superfície do filoplano de feijoeiros expostos ao isolado UFV-172, se comparados com plantas que não foram expostas.

Nesse mesmo contexto, alguns trabalhos têm demonstrado que, quando ocorre o fenômeno de indução de resistência, a planta tende a desviar energia da produção e do próprio desenvolvimento, para ativação de rotas metabólicas e produção de proteínas e de sinais químicos envolvidos no fenômeno de indução (Du & Klessig, 1997; Leite *et al.*, 1999; Romeiro, 1999; Sticher, 1999). E isso teoricamente faria com que a produção da planta diminuísse, em relação a uma planta protegida com um fungicida tradicional, que não demanda gasto energético da mesma (Coley *et al.*, 1985; Purrington 2000; Heil 2001; Brown, 2002; Heil, 2002). Estes resultados não foram observados nos ensaios realizados em campo quando o isolado foi aplicado uma única vez, nem quando foi aplicado semanalmente (artigo 4).

A fim de se obter uma explicação mas clara sobre a real possibilidade do fenômeno de indução de resistência estar ou não ocorrendo é preciso que os

testes enzimáticos sejam realizados. Também, é preciso entender como se dá o mecanismo de sinalização entre a planta e o isolado, quais moléculas estão envolvidas, etc., tal qual foi feito por Romeiro *et al.* (2005).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. Bacterial of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v.89, n.5, 353-359, 1999.
- BROWN, J. K. M. Yield penalties of disease resistance crops. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p.1-6, 2002.
- COLEY, P.D.; BRYANT, J. P. & CHAPIN, F. S. Resource availability and plant antiherbivore defense. **Science**, v. 230, p. 895-899, 1985
- DU, H. & KLESSIG, D. F. Identification of a soluble, high affinity salicylic-binding protein in tobacco **Plant Physiology**, v. 113, n.12, 1997.
- EKICI, O. K. & YUEN, G. Y. Comparison of strains of *Lysobacter enzymogenes* and PGPR for induction of resistance against *Bipolaris sorokiniana* in tall fescue. **Biological Control**, v. 30, n. 4, p. 446-455, 2004.
- FREITAS, L. G.; OLIVEIRA, R. D. L. & FERRAZ, S. **Introdução à Nematologia**, Viçosa, Editora UFV, 1999. 84p.
- HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Tese (Doutorado), 2002. 98p.
- HIRANO, S. S. & UPPER, C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n.3, p. 624-653, 2000.
- HEIL, M. The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). **European Journal of Plant Pathology**, v.107, n. 1, p.137-146, 2001.
- HEIL, M. Ecological costs of induce resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.2, p111-116, 2002.
- KADO, C.I. & HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969 – 979, 1970.

- KESSMANN, H; STAUB, T.; HOFFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J. WARD, E.; UKNES, S. & RYALS, J. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v.32, p.439-459, 1994.
- KINKLE, L.L. Microbial population dynamics in leaves. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.327-347, 1997.
- LEITE, B.; RONCATO, L.DB; PASCHOLATTI, S.F. LAMBAIS, M. R. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos fitopatogênicos, **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 12, pág. 23-57, 2003.
- LINDOW, S.E. & LEVEAU, J. H.J. Phyllosphere microbiology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.3, p. 238-243, 2002.
- LINDOW S. E. & BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, n. 4, p. 1875-1883, 2003.
- PIETERSE, C. M. J.; VANPELT, J. A.; TON, J.; PARCHMANN, S.; MUELLER, S.; BUCHALA, A.J. MÉTRAUX, J. P & van LOON, L. C. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by increase in their production. **Physiological Molecular Plant Pathology**, v. 57, n.1, p.123-134, 2000.
- PURRINGTON, C. B. Costs of resistance. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, n. 2, p.305-308, 2000.
- RESENDE, M. L.V.; BARRETTI, P.B.; DIAS, W. P. Percepção, transdução e tradução de sinais para respostas de defesa contra patógenos em plantas In: **Simpósio de Biologia Molecular da Resistência de Plantas a patógenos: aplicações no manejo integrado de fitodoenças**, 1, Lavras, p.9, 2002.
- ROMEIRO, R.S. & KIMURA, O. Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified bacterial elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*. **Journal of Phytopathology**, v. 145, n. 4, p. 495-498, 1997.
- ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos**, Viçosa, Editora UFV, 1999. 45p.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**, Editora UFV, Viçosa, MG, Brasil, 2001, 297p.
- ROMEIRO, R. S. ISR-SAR: pesquisa com procariontes para a indução de resistência sistêmica em plantas a patógenos, na Universidade Federal de Viçosa. In: **Simpósio de Biologia Molecular da Resistência de Plantas a patógenos: aplicações no manejo integrado de fitodoenças**, Lavras, UFLA, p. 87, 2002. (Resumo)

- ROMEIRO, R. S.; LANNA FILHO, R.; VIEIRA JÚNIOR, J. R.; SILVA, H. S. A.; BARACAT-PEREIRA, M.C. & CARVALHO, M.G. Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. **Journal of Phytopathology**, v.153, n.1, p.120-123, 2005.
- ROSS, A. F. Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. **Virology**, v.14, n.3, p. 340-358, 1961.
- SILVA, H. S. A. **Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares e como promotoras do crescimento em tomateiro.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, Tese de Doutorado.2002, 108p.
- SILVA, H. S. A.; ROMEIRO, R.S.; CARRER-FILHO, R.; PEREIRA, J. L.A.; MIZUBUTI, E. S. G & MOUTNEER, A. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus*, against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n.2, p. 371-375, 2004
- STADNIK, M. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, v.23, supl., p.176-181, 2000.
- STEINER, U & SCHONBECK, F. Induced resistance in monocots. In: HAMMERSCHMIDT & KUC, J. (Ed.). **Induced Resistance to Disease in Plants- Developments in Plant Pathology**, v.4, Dordrecht, Kluwer Academic Publisher, 1995.
- STICHER, L. MAUCH MANI, B & METRAUX, J. P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 35, p.235-270, 1997.
- TOSI, L. & ZAZZERINI, A. Interactions between *Plasmopara helianthi*, *Glomus mossae* and two plant activators in sunflower plants. **European Journal of Plant Pathology**, v.106, n. 6, p. 735-744, 2000.
- 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. 453-483, 1998.
- VIEIRA-JÚNIOR, J.R. HALFELD-VIEIRA, B. A; ROMEIRO, R. S. & NEVES, D. M. S. Procariotas residentes de filoplano como indutores de resistência sistêmica à doenças em plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*). **Summa Phytopathologica**, v.31, supl. P175-176, 2005 (Resumo)

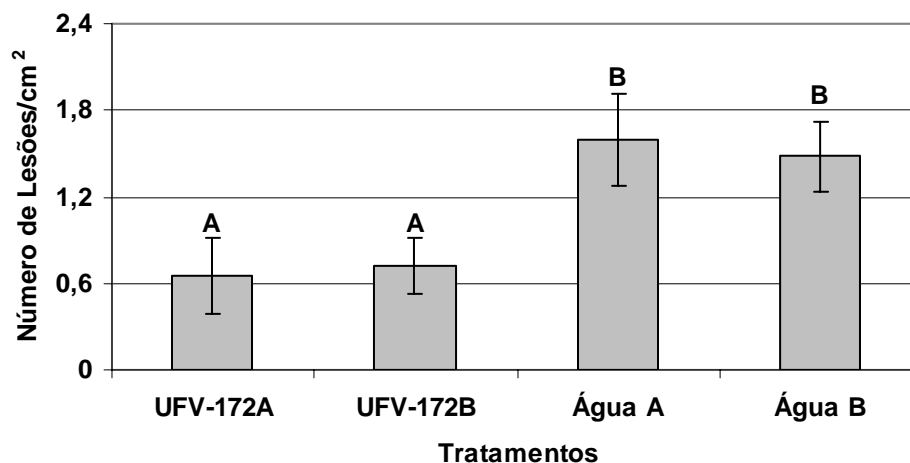


Figura 1-Número médio de lesões de por centímetro quadrado de folhas de feijoeiro cultivar Ouro Negro causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* em plantas previamente expostas ao isolado UFV-172. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de t a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão. A- aplicação do isolado no terço superior; B- aplicação do isolado no terço inferior.

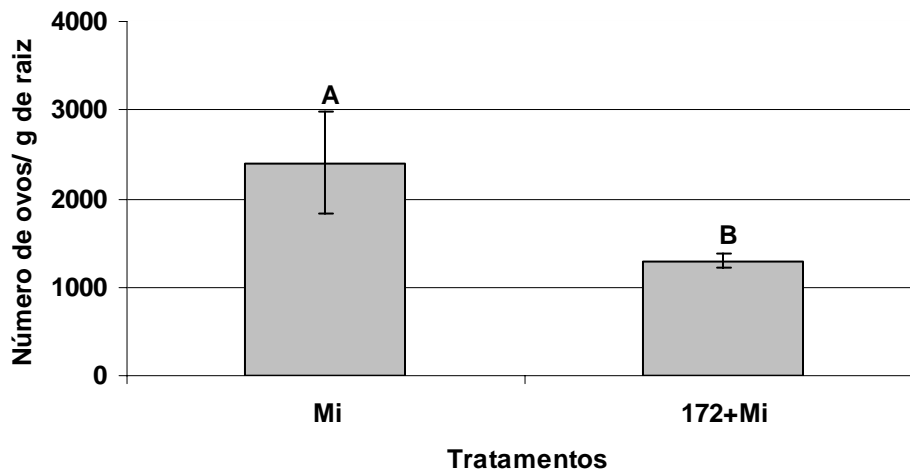


Figura 2-Número médio de ovos de *M. incognita* por grama de raiz extraídos raízes de plantas de feijoeiro cultivar Pérola previamente expostas ao isolado UFV-172. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de t a 5% de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão. Mi- apenas inoculadas com *M.incognita*. 172+Mi- Plantas pulverizadas com o isolado UFV172 e inoculadas com o *M.incognita*

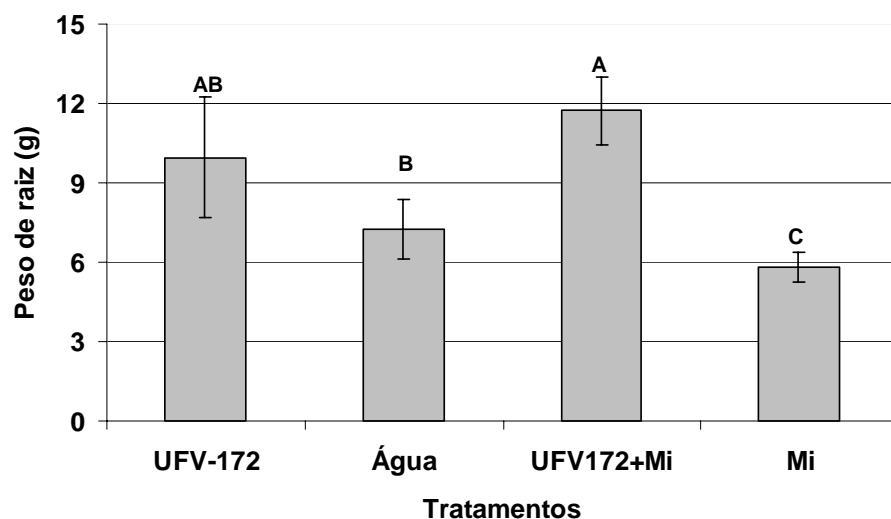


Figura 3-Peso médio de raízes de plantas feijoeiro cultivar Pérola previamente expostas ao isolado UFV-172. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão. Mi-plantas apenas inoculadas com *M.incognita*; UFV172 + Mi-172+Mi-Plantas pulverizadas com o isolado UFV-172 e inoculadas com o *M.incognita*

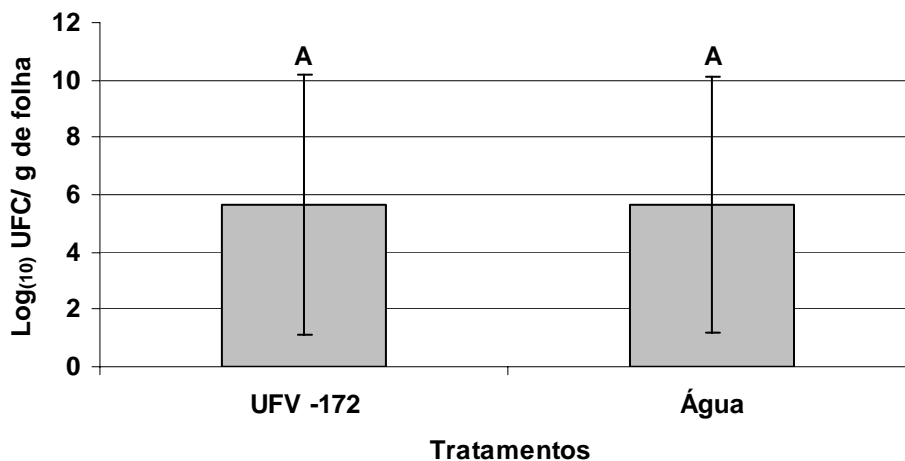


Figura 4-Número de unidades formadoras de colônias (UFC) médio, obtidos de folhas de feijoeiro cultivar Ouro Negro previamente expostas ao isolado UFV-172. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de t 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

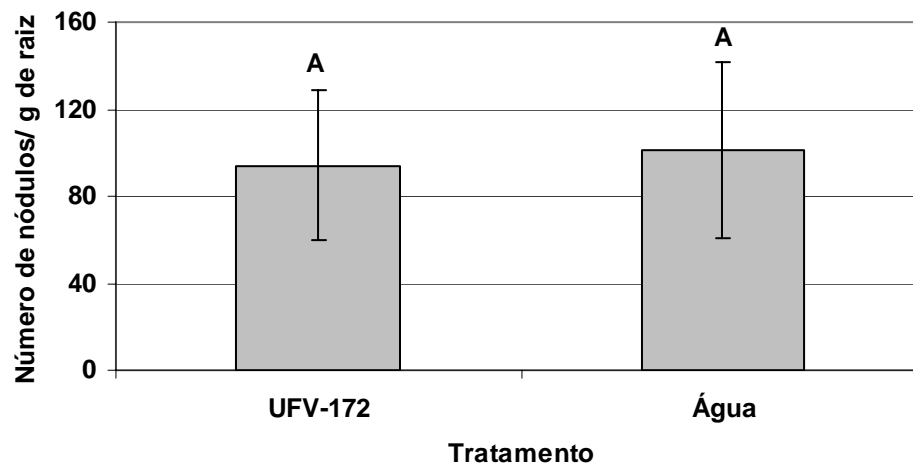


Figura 5-Número médio de nódulos de rizóbio extraídos de raízes de feijoeiro cultivar Pérola previamente expostas ao isolado UFV-172. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de t a 5 % de significância. Os valores apresentados correspondem às médias e os traços representam o desvio padrão.

## ARTIGO 8

### **RESTRICTED MULTIPLICATION OF A BACTERIAL PATHOGEN IN BEAN LEAVES PREVIOUSLY EXPOSED TO *Bacillus cereus*, AN AUTOCHTHONOUS, PHYLLOPLANE-RESIDENT BIOCONTROL AGENT\*.**

J. R. Vieira Junior; R. S. Romeiro<sup>\*</sup>, H. G. M. Ferraz & M. G. Carvalho

Plant Pathology Department, Federal University of Viçosa, Viçosa, MG, Brazil.  
36.571-000. Viçosa, Minas Gerais State, Brazil. E-Mail: rromeiro@ufv.br ; Fax  
number: (55) 3138992240 (\* autor for correspondence).

---

\* artigo submetido para publicação ao periódico European Journal of Plant Pathology

## ABSTRACT

One half of *Phaseolus vulgaris*, ‘Pérola’ dry beans primary leaves were infiltrated with water containing the bacterial pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, isolate 35 (*Xap*), four days after an aqueous suspension of strain UFV-172, *Bacillus cereus* living cells had been sprayed on the same plants. UFV-172 is a bean phylloplane resident known as a promising biocontrol agent. Three antibiotics, to which the antagonist was found quite sensitive and the pathogen totally resistant, were basic in a study on a method and on the possible involved resistance mechanism. At increasing time intervals, discs were removed from the injected half primary leaf, singly ground in PBS and the resulting extract serially diluted. A sample of each dilution was taken onto a culture medium in Petri dishes, half of which containing 50 ppm of each, amoxicillin, penicillin and ampicillin, and the other half with no antibiotic. Comparison of these hence obtained pathogen growth curves for leaves previously exposed to and for those not exposed to the biocontrol agent showed a clearly restricted *Xap* multiplication in leaves initially exposed to *B. cereus*. Data shown are a likely indication that the *B. cereus* isolate controlled the bacterial pathogen through a mechanism of induced systemic resistance.

**Key words:** Induced systemic resistance, *Phaseolus vulgaris* L., *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*.

## INTRODUCTION

When exposed to a true, biotic or abiotic elicitor of systemic resistance, plant tissues react faster and more efficiently when challenged next by a pathogen. Sticher, *et al.*, 1997, called this phenomenon host “conditioning” or “sensitizing”, and Romeiro, 1999, stated that the plant was driven to the “induced state”. To understand induction of systemic resistance in plants to pathogens is of a clearly paramount importance as far as biological control of plant diseases is concerned (Heil, 2001). Rhizobacteria seem to be the best studied of these biotic and inducer organisms. They have been reported as cause of systemic resistance

against plant pathogenic fungi (JetiyAnon, *et al.*, 2003), bacteria (Silva, *et al.*, 2004), nematodes (Kokalis, *et al.*, 2002), and viruses (Murphy, *et al.*, 2003). On the other hand, although prokaryotic phylloplane residents have already been tested and selected as biocontrol agents, only relatively a few reports exist on them in regard to inducing systemic resistance in plants. Among these few Bargabus *et al.*, (2002), Bargabus *et al.*, (2003); Bargabus, *et al.* (2004) demonstrated that an isolate of *Bacillus mycoides* from the sugar beet phylloplane controlled sugar beet leaf spot (*Cercospora beticola*), and Halfeld-Vieira, 2002 and Halfeld-Vieira *et al.*, 2004, out of 300 tested prokaryotic phylloplane residents from healthy tomato plants, selected the UFV-IEA6 strain of *Bacillus cereus* and showed that it induces systemic resistance.

There are guidelines or criteria to be met as assurance that indeed induced resistance accounts for the protection conferred by a biocontrol agent. Steiner and Schönbeck, 1995, formulated seven classical criteria for this purpose and still others exist. Two such criteria: (i) when the resistance shows 'systemicity', *i.e.*, there is an intrinsic systemic character to it (Sticher, *et al.*, 1997) and (ii) when activity of some specific enzymes increases in plant tissues first exposed to a putative elicitor and then challenged by a suitable pathogen (Chen, *et al.*, 2000). Our view is that another acceptable criterion would come from the direct comparison of the pathogen growth curves in the inducer-protected with that in the unprotected plant tissues, once a suitable fungal or bacterial species is used as challenger. Data would show clearly that the pathogen growth has been restricted in the protected, while remaining unaffected in the inducer's absence. This has been demonstrated in works with resistant and susceptible bean plants by Scharen (1959), Goodwin, *et al.* (1995) and also by Mabagala (1997) for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Aware that young coffee leaves are susceptible to infection by *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, while resistant to *P. cichorii*, and that in old coffee leaves precisely the opposite takes place, Oliveira *et al.*, 1991, used a leaf-infiltration method and a bacterial growth comparison technique to demonstrate that lignin-precursor phenol derivatives of only one kind selectively restricted *P. cichorii* growth in the young coffee leaves, while other entirely distinct kind of phenolics, although inoperative against the other species, restricted *P.s. garcae*

cell multiplication in old leaves.

Our report offers a possibly convincing example of a method to demonstrate that an antagonist activity can indirectly and severely restrict a pathogen multiplication *in vivo* and that such data can be understood as a clear indication that induced systemic resistance is the protection mechanism therein involved.

## MATERIALS AND METHODS

### **Microorganisms, their origin, cultivation and maintenance.**

*Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* (Smith, 1987) Vauterin, Hoste Kersters & Swings 1995, XAP 35 isolate (“*Xap*”) is part of the culture collection belonging to the Department of Plant Pathology, Viçosa Federal University, Minas Gerais State, Brazil. The antagonist UFV-172, identified as *Bacillus cereus* by both fatty-acid analysis (FAA) and 16S ribosomal sequencing, was isolated from the phylloplane of healthy bean leaves collected in commercial plantations in Ervália, Minas Gerais State, Brazil, and shown in greenhouse tests and in field experiments (Vieira Junior, *et al.*, 2002) to be a good biocontrol agent for multiple bean diseases. Both isolates were maintained at 4°C on Kado and Heskett’s 523 medium slants, under mineral oil, as well as emulsified cells in 30% v/v glycerin, at -80°C (Gerhardt, 1994). Unless otherwise indicated, bacterial isolates were grown at 28°C in this 523 culture medium (Kado and Heskett, 1970). **Antibiotics and antibiograms.** The gel diffusion bioassay with filter paper disks (LB Laborclin. Pinhais, Parana State, Brazil) previously impregnated with a standardized amount of one antibiotic was the method of choice to run the selective antibiograms. In initial assays, 80 antibiotics were tested for activity against the antagonist (Vieira Júnior, Plant Pathology Department, Viçosa Federal University, Brazil, unpubl.) and, next, based on these results, 43 antibiotics, on both the pathogen and the antagonist. These were qualitative assays only, as every antibiotic was tested equally and at 500 ppm. First a basic, 2-mm thick layer of melted 2% water-agar was transferred into each Petri dish and allowed to solidify. Next, a 2-mm thick layer of melted, semi-solid, 0.8 % agar w/v, at 48° C, of the 523 medium was poured on top of the basic layer; but just before pouring this overlayer, 200 µl of a

bacterial cell suspension from a liquid culture harvested in the exponential growth phase were added to the soft agar and the mixture gently homogenized. Once solidified the upper layer, five antibiotic-impregnated Whatman paper disks per plate were equidistantly deposited on the culture medium surface, within each petri dish, and plates were incubated for 24 to 48 hr at 28° C. Periodically, plates were visually inspected for presence of inhibition haloes. Although the only interest was to determine the resistance spectra (no inhibition haloes) or sensibility to a given antibiotic (visible haloes), diameter in mm of the inhibition haloes was always recorded for the pathogen and the antagonist, and every antibiotic,. Once found to which antibiotics the pathogen and the antagonist were sensitive or resistant, confirmatory antibiograms were performed, in three replicates, with those compounds that met the test purpose, of identifying the antibiotics that, although strongly inhibitory to the antagonist, had no perceptible effect on the pathogen. **Assay with the antibiotic-containing, pathogen-repressive medium.** From a liquid pathogen culture sampled in the logarithmic growth phase, a 1:10 serial dilution in saline (0.85% w/v NaCl) containing 0.05% Tween 80 was prepared and 100 µl of each dilution plated out on the 523 medium in Petri dishes. Two plate series were prepared, one of which containing all three selected antibiotics and, in the other series, plates with no antibiotics at all. Each antibiotic's final concentration in the culture medium was 500 ppm. Plates were incubated for 48 h at 28° C, colonies were counted and cfu/ml figured out in both series. Three replicates were used in this experiment. **Tolerance degree of *Xap* to polyvinylpyrrolidone.** To investigate a possible intolerance of *Xap* to polyvinylpyrrolidone, 0, 0.1, 0.5, 1, 5 and 10% PVP (P-6755, Sigma) w/v solutions in sterile 0.05 M, pH 7.0, PBS were prepared. Double-layer assay plates were prepared as described, with the *Xap* living cells incorporated just before layering the top layer. Symmetrically and equidistantly from the center of each plate, six 5-mm diameter wells were dug in the upper layer gel and 30 µl of each dilution dispensed into each well. PBS with no polyvinylpyrrolidone was the adopted control. Initially plates were kept for 24 hours at 4 °C in a refrigerator to warrant full diffusion of the compound into the medium, and moved next into an incubator at 28° C, in which they were kept for 48 h to

allow inhibition haloes, if any, to develop. All assays were run in three replicates. **Exposure of bean plants to the biocontrol agent.** In a partially-controlled relative air humidity/temperature greenhouse, 20-day-old *Phaseolus vulgaris* 'Pérola' dry bean plants were sprayed with a 0.4 OD<sub>540</sub> (about 1,5x10<sup>10</sup> cfu/ml) propagule suspension in water of the UFV-172 antagonist used at the exponential growth phase. At the same time, as control, other 'Pérola' bean plants of the same size and age were sprayed with water. **Pathogen inoculation.** The pathogen was inoculated four days after the antagonist. The *Xap* 35 inoculum was prepared in saline from 24-h old slants, set at 0.05 OD<sub>540</sub>, about 2,5 x10<sup>7</sup> cfu/ml, and the mesophyll of one-half primary leaf infiltrated by carefully injecting the liquid into the mesophyll, at 4, 5, or 6 sites, with a syringe and hypodermic needle. **Sampling technique and testing of samples .** At 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 and 192 hours after inoculation, five 1-cm diameter, antagonist-sprayed, *Xap*-injected, primary leaf disks were cut with a flamed cork borer from the injected bean half-leaf and from all bean plants in the test. Disks were moved into sterile Petri dishes kept inside an ice-box and taken with no delay to the laboratory. There, their fresh-tissues weight was recorded, they were washed with diluted detergent under tap water, rinsed in distilled water and each ground on ice bath for 40 seconds in 5 ml PBS containing 1% polyvinylpyrrolidone, by using an Ultra-Turrax homogenizer (Janke & Kunkel-IKA-Labortechnik). Each extract was serially diluted (1:10) in sterile PBS. Dilutions (100-µl aliquotes) were plated out in sterile culture medium amended with 50 ppm, final concentration in the medium, of each of the three selected antibiotics. Plates were now incubated for 48 h, at 28° C, when yellowish, mucoid, elevated, brilliant, xanthomonad-like colonies were counted and cfu/g of fresh weight figured out. All dilutions and glassware were cooled before use and these solution-containing glassware always kept on ice bath.

## RESULTS

Within the available set of antibiotics, a few were found to which *Xap* was essentially insensitive and the antagonist *Bacillus cereus* clearly sensitive.

Amoxicillin, ampicillin and penicillin were chosen among them because of their wide-spectrum activity. Tests with increasing concentrations of each of these three also showed that the pathogen was insensitive up to 500 ppm of each. *Xap* 35 was also found to tolerate polyvinylpyrrolidone (PVP) up to 10% (w/v) when tested by diffusion in the 523 medium, hence the 1% concentration was elected comfortable to run the experiments. The antibiotics-containing medium was found negligibly or not at all repressive (Figure 1) to *Xap* when tested to this end using the serially-diluted plates method. Approximately three days after *Xap* injection, the injected sites in the antagonist-free primary leaves started presenting mild, generalized yellowing that evolved with time to necrosis; total leaf tissue collapse ensued and the experiment was over by the eighth day. By then, symptoms in the *B. cereus*-pretreated, *Xap*-challenged leaves evolved up to mild chlorosis only, with no misshapen or otherwise altered leaves. As the *Xap* challenger populations changed in leaves of *B.c.*-treated and untreated bean plants it was found that cfu./g of fresh weight was significantly (Tukey, 0.05 MSD) lower in plants previously exposed to living propagules *Bacillus cereus*, isolate UFV-172, than in those not treated with this isolate (Figure 2).

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Constitutive multiple resistance against amoxicillin, ampicillin, and penicillin became evident in the *Xap* 35 isolate when used the antibiogram technique to screen the available antibiotics. Such property suited well the purpose of finding a medium that while innocuous to the challenger, would be strongly restrictive (Romeiro, *et al.*, 1998) to the *B. cereus*, UFV-172 antagonist. This was a requisite because the two microorganisms soon or later would come together and interact; the antagonist to be spread on the leaf surface, as a phylloplane resident that it is, and the pathogen to be injected next into the same leaf. Besides suppressing growth of the antagonist (Figure 1), the three antibiotics present in the culture medium desirably and presumably excluded all other epiphytic prokaryotes of the bean phylloplane, that otherwise would lead to inflated *Xap* colony numbers. Other requisite in our work was to rule out experimentally a possible *Xap* intolerance to PVP, although Diachum

and Troutman (1954), Goodwin, *et al.* (1995), Kawamoto (1972), Mabagala, (1997) and Oliveira, *et al.*(1991) had no mention of such care in similar studies. PVP has been used to prevent oxidation in plant extracts (Silva, *et al.*, 2004) and it is well established that plant phenol oxidative derivatives, phenolics, can be toxic to bacteria (Agrios, 1997; Goodman and Novacky, 1994; Goodman, 1986). Preliminary tests had shown that bean leaf extracts turned dark brown in less than a minute, unless chemicals were used to prevent or delay the oxidation events that go along with tissue disintegration and the release of oxidative enzymes and their substrates.

Data in Figure 2 clearly show that, when compared to tissues of the untreated control, the leaf tissues of bean plants previously exposed to *B. cereus*, UFV-172 isolate, strongly restricted the *Xap* challenger multiplication. In the control leaves, the *Xap* population evolved to yield an almost typical unchecked bacterial growth curve in a liquid medium, with the evident lag, exponential, stationary and death phases. This is in sharp contrast with the curve pattern for the antagonist-treated bean plants and four days later recipient of the *Xap* cells, where the *Xap* curve falls almost constantly from the start. Not fail to consider that the log representation in Figure 2 actually translates in that the cfu. recovered from the leaf tissues are up to one million times larger in the unexposed than in the antagonist-exposed tissues. It is also significant that about 70 hours from the beginning, the *Xap* 35 bacterial growth in the unexposed beans had reached the curve inflexion point, while in the previously *B. cereus*-exposed plant tissues the *Xap* growth was about to start a steady decline until it fell to zero cfu. at about 190 hours.

In our view, a few other crucial aspects emerging from the comparison of these two evolving bacterial curves shed some light on how precisely this selected resident functions as a biocontrol agent. In previous work Vieira Junior, *et al.* (2002), strain UFV-172 was shown to exert no direct antagonism against bacterial or fungal bean pathogen and yet it still provided a good biological control of bean plants against multiple pathogens. Once put together, these facts spell out characteristics of induced systemic resistance (Heil, 2001; Koepler, *et al.*, 1997; Sticher, *et al.*, 1997; Van Loon, *et al.*, 1998). Thus the data now reported are one additional evidence that the *B. cereus* strain under

investigation, UFV-172, is a true ISR agent and that such might well be its only or main mechanism of action. Nevertheless, a few somewhat different explanations still can be forwarded to account for this mechanism. One of these is that UFV-172 would synthesize exportable macromolecules which, once in contact with the bean phylloplane, would trigger ISR. For it has been shown by Romeiro, *et al.* (2005) that such is what happens in tomato plants when initially exposed to *Bacillus cereus*, strain UFV-101, actually a PGPR, for this strain renders this plant protected against several pathogens.

Since there are only a few reports on phylloplane residents as biocontrol agents for plant diseases, and even less so, as ISR elicitors, our present data may be useful to show phylloplane residents in a somewhat different and stimulating research perspective.

## REFERENCES

- Agrios, G.N. (1997). Plant Pathology. Academic Press, New York
- Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE and Jacobsen BJ (2002) Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological Molecular Plant Pathology* 61: 289-298.
- Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE and Jacobsen BJ (2003) Oxidative burst elicited by *Bacillus mycoides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 1145-1153.
- Bargabus RL, Zidack NK, Sherwood JE and Jacobsen BJ (2004) Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control*. 30: 342-350.
- Chen C, Belanger RR, Benhamou N, Paulitz TC and Chen CQ (2000) Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 13-23.
- Diachum S and Troutman J (1954) Multiplication of *Pseudomonas tabaci* in leaves of burly tobacco *Nicotiana longiflora* and hybrids. *Phytopathology* 44: 186-187.

- Gerhardt PE, Murray RGE, Wood WA and Krieg NR (1994) *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology, Whashington.
- Goodman RN and Novacky AJ (1994) *The hypersensitive reaction in plants to pathogens*. American Phytopathological Society Press, Saint Paul.
- Goodman RN, Király Z and Wood KR (1986) *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. University of Missouri Press. Columbia
- Goodwin PH, Sopher CR and Michaels TE (1995). Multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and intracellular enzyme activities in resistant and susceptible beans. *Journal of Phytopathology* 143: 11-15.
- Halfelf-Vieira BA (2002). Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura, Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa.
- Halfeld-Vieira BA, Romeiro RS and Mizubuti ESG (2004). Métodos de isolamento de bactérias do filoplano do tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatologia Brasileira* 29:638-643.
- Heil M. (2001) Induced systemic resistance (ISR) against pathogens: A promising field for ecological research. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics* 4: 65-79.
- JetiyAnon K, Fowler WD, Kloepper JW and Kanchalee J (2003) Broad-spectrum protection against several pathogens by PGPR mixtures under field conditions in Thailand. *Plant Disease* 87: 1390-1394.
- Kado CI. and Heskett MG (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969 - 979.
- Kawamoto SO (1972) Multiplication of *Pseudomonas cepacia* in onion leaves. *Phytopathology* 62: 1263-1265.
- Koepler JW, Tuzun S, Zehnder GW and Wei G. (1997) Multiple disease protection by rhizobacteria that induced systemic resistance-Historical precedence. *Phytopathology* 87: 136-137.
- Kokalis BN, Vavrina CS, Roskopf EN and Shelby, RA (2002) Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil* 238: 257-266.
- Mabagala RB (1997) The effect of populations of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean reproductive tissues on seed infection of resistant and susceptible bean genotypes. *European Journal of Plant Pathology* 103: 175-181.

Murphy JF, Reddy MS, Ryu CM, Kloepper JW and Li R. (2003) Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. *Phytopathology* 93: 1301-1307.

Oliveira JR, Romeiro RS. and Muchovej JJ (1991) Population tendencies of *Pseudomonas cichorii* and *P. syringae* pv. *garcae* in young and mature coffee leaves. *Journal of Phytopathology* 131: 210-214.

Romeiro RS (1999) Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. Editora UFV, Viçosa.

Romeiro RS, Filho RL, Vieira-Júnior JR, Silva HSA, Baracat-Pereira MC and Carvalho, MG (2005). Macromolecules Released by a Plant Growth-promoting Rhizobacterium as Elicitors of Systemic Resistance in Tomato to Bacterial and Fungal Pathogens. *Journal. Phytopathology* 153: 120–123.

Romeiro RS, Moura AB, Oliveira JR, Silva GSA, Barbosa LS, Soares FMP and Peres F (1998) Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. *Summa Phytopathologica* 24: 213-218.

Scharen AL (1959) Comparative population trends of *Xanthomonas phaseoli* in susceptible, field Tolerant and resistant hosts. *Phytopathology* 49: 425-428.

Silva HSA., Romeiro RS, Macagnan D, Halfeld-Vieira BA, Baracat-Pereira MC and Mounteer A (2004). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control* 29: 288-295.

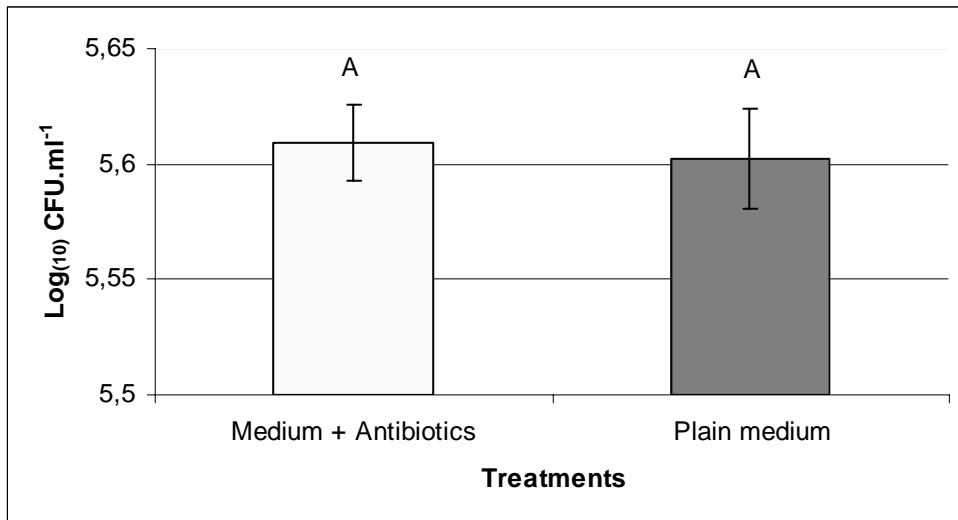
Silva MR. (2002). Comparação da eficiência de meios semi-seletivos para a detecção do *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa.

Steiner U and Schönbeck F (1995). Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt R & Kuc J. (ed.) *Induced Resistance to Disease in Plants (Developments in Plant Pathology)*. Vol. 4 (pp. 86-110) Kluwer Academic Publisher, Ordrech.

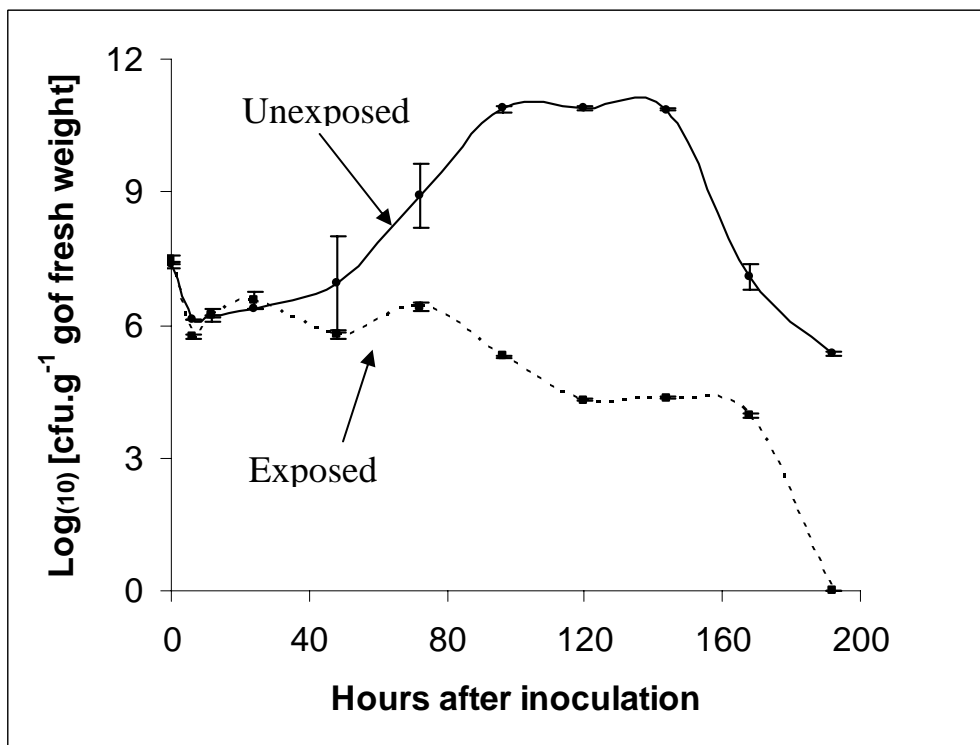
Sticher L, Mauch Mani B and Mettraux JP (1997) Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35: 235-270.

Van Loon LC, Bakker PAHM and Pieterse CM J (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36: 453-83.

Vieira Junior JR, Romeiro RS, Vieira RF and Soares DJ (2002). Seleção de bactérias residentes de filoplano de feijoeiro como agentes de biocontrole de duas enfermidades bacterianas da parte aérea. In: Vieira, C (ed.) VII Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. (pp.159-162) Editora UFV, Viçosa.



**Figure 1.** Challenger *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*, isolate *Xap* 35, grew unaffected in the Kado & Heskett's 523 culture medium amended with amoxicillin, penicillin, and ampicillin, 50 ppm each, that suppresses growth of the UFV-172 antagonist. (LSD 0.05 Tukey, no significance).



**Figure 2** – Populational tendencies of *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli*, (Isolate *Xap* 35) in bean leaf tissues previously exposed and not exposed to the biocontrol agent, *B. cereus* UFV-172 isolate.

## CONCLUSÕES GERAIS

De 500 isolados obtidos do filoplano do feijoeiro, três foram selecionados como promissores para o controle biológico de doenças da cultura. Os isolados UFV-75, UFV-172 e UFV-108 reduziram a severidade do cretamento bacteriano comum e da mancha angular.

Antibiose, embora tenha sido um fenômeno comum entre os isolados testados, não poderia ter sido usado como critério único de seleção de microrganismos para controle biológico de doenças, pois ela não leva em conta outras formas de biocontrole, como a indução de resistência sistêmica de plantas, como no caso específico do isolado UFV-172 (*Bacillus cereus*). Além disso, nem sempre que o fenômeno de controle se expressou *in vitro* ele foi observado *in vivo*. Por outro lado, o estudo de biocontrole de doenças pelos microrganismos *in vitro* pela antibiose, ajudou a explicar porque os isolados UFV-75 (*Bacillus cereus*) e UFV-108 (*Pseudomonas putida*) de controlar doenças *in vivo*, a partir da observação ocorrência dos mecanismos envolvidos na antibiose direta como: a produção compostos voláteis, sideróforos, bacteriocinas, etc. Os resultados da antibiose direta deram os primeiros indícios de que o isolado UFV-172 poderia estar induzindo resistência em plantas de feijoeiro.

Os isolados UFV-75, UFV-108 e UFV-172, mostraram-se eficientes no controle da ferrugem e da mancha angular, reduzindo a taxa de progresso e a severidade das mesmas. E associado ao controle, os isolados indiretamente favoreceram ao aumento da produção pelas plantas.

O isolado UFV-74 (*Pseudomonas putida*) que também pode atuar como agente de biocontrole promoveu o crescimento de plantas de feijoeiro, aumentando o tamanho das plantas e das folhas e a produtividade por planta, quando aplicado tanto nas folhas, quanto via microbiolização de sementes.

Os antagonistas UFV-75, UFV-108 e UFV-172 foram compatíveis com a maioria dos produtos comerciais testados, embora tenha havido incompatibilidade com fungicidas cúpricos com o manzate. Também foi possível identificar antibióticos aos quais os isolados são insensíveis,

informação útil para os estudos futuros estudos de sobrevivência dos isolados no campo, para estudos de compatibilidade dos isolados, entre outros.

Os isolados foram eficientes nos controle do cretamento bacteriano comum, independentemente da cultivar utilizada, embora a eficiência de controle tenha se mostrado maior nas cultivares 'Pérola' e 'Valente' e menor nas cultivares 'Ouro Negro', 'Diamante Negro' e 'Meia-Noite'.

Quanto ao efeito da idade das plantas, todos os isolados mostraram-se incapazes de controlar o cretamento bacteriano comum, quando a doença ocorria em plantas com idade superior a 70 dias após a emergência. Também foi observado que mesmo o patógeno *X. a. pv. phaseoli* não foi eficiente em colonizar as folhas do feijoeiro em senescência.

Em se tratando da amplitude de controle, os isolados foram capazes de controlar todos os patógenos foliares do feijoeiro testados

É possível afirmar que o isolado UFV-172 esteja se comportando como um agente indutor de resistência sistêmica a doenças, baseado no efeito de controle de doenças de parte aérea e de solo e na não ação direta dele sobre os patógenos testados. Esse fato é corroborado pelos ensaios de supressão de multiplicação de *X. a. pv. phaseoli* nos tecidos de folhas de feijoeiro, quando as plantas foram previamente pulverizadas com suspensão de células de UFV-172.

A indução de plantas por *Bacillus cereus* (UFV-172) não afetou nem a planta, quanto a produção e desenvolvimento normal de raízes, nem a microbiota saprofítica das folhas e nem a microbiota benéfica nas raízes, e na nodulação de rizóbio nas raízes, quando a planta entrou em contato com o isolado.

Há potencial na utilização de procariotas residentes de filoplano como agentes de biocontrole de doenças foliares da cultura.