

FLÁVIO AUGUSTO DE OLIVEIRA GARCIA

BIOCARACTERIZAÇÃO DE PROCARIOTAS COMO AGENTES DE
BIOCONTROLE DE ENFERMIDADES E COMO PROMOTORES DE
CRESCIMENTO EM FEIJOEIRO.

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

T

G216b
2008

Garcia, Flávio Augusto de Oliveira, 1977-
Biocaracterização de procariotas como agentes de
biocontrole de enfermidades e como promotores de
crescimento em feijoeiro. / Flávio Augusto de Oliveira
Garcia. – Viçosa, MG, 2008.
xi, 132f.: il. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

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

CDD 22.ed. 635.65294

FLÁVIO AUGUSTO DE OLIVEIRA GARCIA

BIOCARACTERIZAÇÃO DE PROCARIOTAS COMO AGENTES DE
BIOCONTROLE DE ENFERMIDADES E COMO PROMOTORES DE
CRESCIMENTO EM FEIJOEIRO.

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

APROVADA: 31 de julho de 2008.

Prof. Fabio Lopes Olivares

Dr. Wagner Bettiol

Prof^a. Maria Cristina Baracat Pereira
(Co-orientadora)

Prof. José Rogério de Oliveira
(Co-orientador)

Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Orientador)

Aos meus pais Sebastião e Odete, pelo amor incondicional

Aos meus irmãos Marcelo e Rita de Cássia, pelo companheirismo

A minha amada Érica, pela devoção e pelo carinho

Ao Professor Reginaldo, por tantas razões que nem saberia
descrevê-las.

Dedico

Parece que foi ontem, aquele dia nublado de maio, que, por recomendação de minha mãe, fui até ao laboratório. Mas que laboratório! Nem sabia que havia mais de um laboratório naquele prédio; porém, fui lá procurar o tal Professor Reginaldo Romeiro. Não tinha a menor idéia quem era esse professor, afinal de contas ele não lecionava disciplinas do curso de Engenharia Florestal e eu mal conhecia os professores que pertenciam à grade do meu curso, quanto mais os de outros cursos. Para minha surpresa, ao entrar no laboratório encontrei tipos bem “estranhos”. Ao contrário de pessoas com jalecos luvas e com cara de “nerds”, havia um que mascava um chiclete e com jeito de peão de boiadeiro, um catarinense com sotaque de baiano, um que agradecia a Deus porque não ia ser pai naquela semana e outro que quase não falava, mais ficava a observar todos. Ao perguntar pelo professor Reginaldo, percebi um ar de sarcasmo em seus rostos, pensei que estivesse perdido. Imaginei que deveria ser uma pessoa de difícil acesso, pois se tratava de um dos mais ilustres membros da UFV. Porém, ao entrar em sua “salinha”, uma imensa surpresa. Fui recebido por um jovem senhor de seus cinquenta e poucos anos, amável, que conversou comigo com extrema humildade e, confesso, que até hoje me assusta. Terminada a conversa já estava admitido no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico ou laboratório do Professor Reginaldo e tornei-me um de seus pupilos. Lá se vão mais de oito anos desde esse dia. E as coisas que aprendi com o professor Reginaldo nesses anos foram muito além de lavar vidrarias, repicar bactérias, contar colônias, escrever trabalhos. Sobre a batuta de meu mestre fui a lugares que jamais sonhara em ir, conheci pessoas que em minha mente nunca haviam habitado, vivenciei coisas que somente uma mente privilegiada como a sua poderia me mostrar. Porém, o bem mais precioso que consegui foi a amizade deste hoje senhor, mas com a mente mais jovial que já conheci. Infelizmente é hora de partir e ficar sem sua proteção, mas não sem antes lhe dizer: Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao povo brasileiro que, ao longo de seu sacrifício custeou, todo o meu ensino.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial 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 Romeiro, por ter me acolhido e ter feito de mim um profissional que nunca seria sem sua orientação, amizade e carinho. Portanto, a ele minha eterna gratidão.

Aos Professores José Rogério de Oliveira e Maria Cristina Baracat-Pereira, pela amizade, incentivo, paciência e conselhos.

Ao Professor Fábio Olivares e ao Dr. Wagner Bettiol, pelas sugestões.

Ao Professor Francisco Alves Ferreira, pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

À Dra. Poliane Alfnas Zerbina e ao Professor Francisco Murilo Zerbini Júnior, pela inestimável ajuda.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos ao longo desses anos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, especialmente o Sr. José Bruno Ferreira, pela valiosa ajuda.

Aos colegas de laboratório, Helvio, Roberto, Mônica, Adriana e Thaís, que me ajudaram a tornar essa tarefa mais prazerosa.

A todos que, de alguma forma, ajudaram neste trabalho.

CONTEÚDO

RESUMO	x
ABSTRACT	xii
Introdução Geral	1
Referências	4
CAPÍTULO 1	8
Biocontrole do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro (<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>) por Procariotas em Condições de Casa de Vegetação	8
Resumo	8
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	10
Microrganismos, sua origem e cultivo	10
Preparo da suspensão de propágulos dos microrganismos	11
Biocontrole em casa de vegetação	11
Resultados e Discussão	12
Referências	14
CAPÍTULO 2	19
Indução de Resistência em Plantas de Feijoeiro pela Dispensa de Cinco Procariotas em seu Filoplano	19
Resumo	19
Abstract	20
Introdução	21
Material e Métodos	22
Material vegetal e tratamentos	22
Preparo do extrato vegetal	23
Determinação de proteínas totais	23
Detecção de atividade de lipoxigenase	23
Detecção de atividade de β -1,3-glucanase	24
Detecção de atividade de fenilalanina-amônia liase	24
Detecção de atividade de peroxidase	25
Detecção de atividade de quitinase	25
Biocontrole em casa de vegetação	26
Resultados e Discussão	26
Referências	31
CAPÍTULO 3	43

Promoção de Crescimento em Feijoeiro pela Dispensa de Procariotas no Filoplano de Plantas da Cultura.....	43
Resumo	43
Abstract.....	44
Introdução.....	45
Material e Métodos.....	46
Microorganismos, sua origem e cultivo	46
Preparo dos microrganismos	47
Promoção de crescimento em casa de vegetação	47
Promoção de crescimento em condições de campo.....	48
Resultados.....	48
Discussão	49
Referências	51
CAPÍTULO 4	59
Biocontrole da Mancha Angular do Feijoeiro, pela Dispensa de Antagonistas no Filoplano.....	59
Resumo	59
Abstract.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	62
Antagonistas, sua origem e cultivo.....	62
Ensaio de campo.....	62
Resultados.....	63
Discussão	64
Referências	66
CAPÍTULO 5	75
Controle da Ferrugem do Feijoeiro (<i>Uromyces appendiculats</i>) pela Co-dispensa de Procariotas Previamente Seleccionados, em dois cultivares.....	75
Resumo	75
Abstract.....	76
Introdução.....	77
Material e Métodos.....	78
Microorganismos, sua origem e cultivo	78
Preparo da suspensão de propágulos dos microrganismos.....	78
Ensaio de campo.....	79
Resultados e Discussão.....	79
Referências	81
CAPÍTULO 6	91

Competição por Nutrientes e por Nichos Ecológicos como Possíveis Mecanismos de Biocontrole do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro por um Isolamento de <i>Bacillus cereus</i>	91
Resumo	91
Abstract.....	92
Introdução.....	93
Material e Métodos.....	94
Microrganismos, sua origem e cultivo	94
Antibiose <i>in vitro</i>	94
Biocontrole experimental em vagens de feijão para evidenciação de competição por nicho ecológico.....	95
Utilização de diferentes fontes nutricionais para evidenciação de competição por nutrientes	96
Resultados e Discussão.....	96
Referências	99
CAPÍTULO 7	106
Tendência Populacional de Agentes de Biocontrole Dispensados no Filoplano de Plantas de Feijoeiro	106
Resumo	106
Abstract.....	107
Introdução.....	108
Material e Métodos.....	109
Antagonistas, sua origem e cultivo.....	109
Proposição de meio semi-seletivo para estudo da dinâmica populacional de dois isolamentos de <i>B. cereus</i>	109
Seleção de mutantes para o estudo de dinâmica populacional	110
Monitoramento da tendência populacional de três agentes de biocontrole residentes de filoplano em casa de vegetação.	111
Resultados e Discussão.....	111
Referências	114
CAPÍTULO 8	119
Indução de Síntese de Gliceolina como Resposta de Cotilédones de Soja à Exposição a Células Viáveis, Extratos e Metabólitos de um Isolamento de <i>Bacillus cereus</i> , agente de Biocontrole de Doenças do Feijoeiro	119
Resumo	119
Abstract.....	120
Introdução.....	121
Material e Métodos.....	122
Tratamentos e seu preparo	122

Ensaio com cotilédones de soja.....	123
Resultados e Discussão.....	123
Referências	125
CONCLUSÕES GERAIS	130

BIOGRAFIA

FLÁVIO AUGUSTO DE OLIVEIRA GARCIA, filho de Sebastião Garcia Barbosa e Odete de Oliveira Garcia, nasceu em Viçosa, Minas Gerais, no dia 17 de maio de 1977.

Ingressou, em 1997, no curso de Engenharia Florestal da Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo bolsista de Iniciação Científica do Departamento de Fitopatologia, sob a orientação do Professor Reginaldo da Silva Romeiro.

Graduou-se em maio de 2003 e, no mesmo mês, ingressou no Programa de Pós-graduação em Fitopatologia da UFV, em nível de mestrado, defendendo tese em julho de 2004.

Em agosto deste mesmo ano, ingressou-se no curso de Doutorado em Fitopatologia da UFV, concluindo em julho de 2008.

RESUMO

GARCIA, Flávio Augusto de Oliveira. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2008. **Biocaracterização de procariotas como agentes de biocontrole de enfermidades e como promotores de crescimento em feijoeiro.** Orientador: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-orientadores: José Rogério Oliveira e Maria Cristina Baracat-Pereira.

O Brasil é o principal produtor de feijão no mundo, com mais de três milhões de toneladas produzidas anualmente. Esta produtividade poderia ser maior, porém, vários fatores têm impedido que a produção do país aumente, entre eles, a ocorrência de doenças durante o ciclo da cultura. Mais de uma centena de patógenos já foram relatados atacando o feijoeiro. O cretamento bacteriano comum, a mancha angular a ferrugem e a antracnose são as principais doenças da parte aérea da cultura, que ocorrem no Brasil. Essas podem reduzir a produção em mais de 50%, sob condições favoráveis. As medidas de controle indicadas para essas doenças não apresentam boa eficácia, em razão da pouca eficiência de produtos químicos e da alta variabilidade dos patógenos. Assim, o controle biológico surge como uma alternativa para o manejo integrado de doenças. Dentre os organismos estudados, as bactérias, sejam da rizosfera, endofíticas, ou residentes de filoplano, têm demonstrado grande potencial para o biocontrole. Objetivou-se neste trabalho avaliar a capacidade de cinco procariotas, sendo três isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101 e UFV-075) e dois isolamentos de *Pseudomonas putida* (UFV-053 e UFV-Pp), como agentes de biocontrole de doenças de parte aérea do feijoeiro, determinar os possíveis mecanismos de controle envolvido, assim como a tendência populacional dos antagonistas no filoplano de feijoeiro. Em ensaios em casa de vegetação, conduzidos ao longo de um ano, os cinco isolamentos bacterianos demonstraram ser eficientes em

controlar o crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). Nos ensaios feitos em casa de vegetação e a campo, os isolamentos UFV-172 e UFV-075 demonstraram ser capazes de promover o crescimento de plantas de feijoeiro. Quando os mecanismos de controle foram estudados, observou-se que os cinco antagonistas eram capazes de induzir a resistência sistêmica em plantas de feijão, em que o aumento da atividade de enzimas indicadoras do estado de indução foi observado, assim como o controle do crestamento bacteriano comum, quando havia separação espacial entre o antagonista e o patógeno. Em um bioensaio realizado com cotilédones de soja, os isolamentos UFV-172 e UFV-075 (células viáveis, extratos de frações celulares e seus metabólitos) foram capazes de eliciar a síntese de gliceolina, uma fitoalexina, reconhecida como um mecanismo de resistência induzido em plantas. Em dois bioensaios, foi observado o envolvimento da competição por nichos ecológicos e por nutrientes, como parte dos mecanismos de controle exercidos pelo isolamento de UFV-172. Em um ensaio a campo, testou-se a co-dispensa dos isolamentos UFV-075 e UFV-053, como forma de aumentar a eficácia do controle; porém, não houve diferença entre o controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus*), exercido quando eram dispensados individualmente e quando eram co-dispensados. Em dois ensaios a campo, observou-se a eficácia dos cinco antagonistas no controle da mancha angular do feijoeiro (*Pseudocercospora griseola*), em duas épocas diferentes de plantios.

ABSTRACT

GARCIA, Flávio Augusto de Oliveira. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2008. **Biocharacterization of prokaryotes as biocontrol agents and growth promoters for beans.** Adviser: Reginaldo da Silva Romeiro. Co-advisers: José Rogério Oliveira and Maria Cristina Baracat-Pereira.

Brazil is the most important bean producer in the world (3 million tons per year). This productivity could be higher but several impairing factors exist and one of them is the continuous occurrence of diseases along the crop cycle. More than one hundred pathogens have been reported causing diseases in beans and the common bacterial blight, angular spot, rust and anthracnose are the most important aerial part diseases in Brazil bringing about losses as large as 50% under ideal conditions for disease incidence. Control measures for the aforementioned diseases do not present good efficacy mostly due low efficiency of chemicals along with the high pathogen variability. Therefore, the possibility of biological control turns into an actual alternative for the integrated management of diseases. Among organisms under investigation, rhizobacteria as well as bacterial endophytes and prokaryotic phylloplane residents have shown good potential for the biocontrol. The main purpose of this dissertation was to evaluate the ability of five prokaryotes, being three isolates of *Bacillus cereus* (isolates UFV-172, UFV-101 and UFV-075) and two isolates of *Pseudomonas putida* (isolates UFV-053 and UFV-Pp) as biocontrol agents for aerial part diseases in beans as well as to investigate the possible mechanisms involved in the observed biocontrol and to monitor populational tendencies of the biocontrol agents in bean phylloplane. Greenhouse assays, with replicates in time and in space, along a whole year, indicated that the organisms were efficient for controlling the common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). In terms growth-promoting

ability, isolates UFV-172 and UFV-075 proved to be efficient, either in a greenhouse or in field trials. Investigation on mechanisms on the observed biological control, it was found that the five organisms were inducers of systemic resistance in bean plants, there were increases in the activity of the so called indicator enzymes of the induced state, as well as effective biocontrol of the common bacterial blight even after spatial separation of the microbial components of the interaction. In a standard bioassay with soybean cotyledons, isolates UFV-172 and UFV-075 of *Bacillus cereus* (viable cells, cell extracts and supernates of liquid cultures) were able to act as elicitors of the phytoalexin glyceollin that is known as a product of activated mechanisms of induced resistance in soybean. In two bioassays, it was observed the occurrence of biocontrol mechanisms such as competition for ecological niches and for nutrients, in the case of the tested isolate UFV-172. In a field experiment, the simultaneous deliver of isolates UFV-075 and UFV-053 did not improve the efficiency of isolates delivered separately, for the biocontrol of bean rust (*Uromyces appendiculatus*). A field assay, repeated twice in time along a given year, it was observed the efficiency of all five isolates for promoting the biocontrol of the angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*).

Introdução Geral

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, com uma produção superior a três milhões de toneladas, o que corresponde a 16,3% da produção mundial (EMBRAPA, 2006; FAOSTAT, 2008). Quanto a área plantada, o feijoeiro só perde em importância para a soja, o milho e o algodão.

Os grãos de feijão representam importante fonte protéica na dieta humana, principalmente nos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, o feijão é um dos componentes básicos da dieta alimentar da população. O continente americano responde por 43,2% do consumo mundial, seguido pela Ásia (34,5%), África (18,5%), Europa (3,7%) e Oceania (0,1%). Os países em desenvolvimento são responsáveis por 86,7% do consumo mundial. No Brasil, o consumo per capita de feijão, na década de 1970, foi de 18,5 kg.hab⁻¹ano⁻¹ e, em 2002, de 16,3 kg⁻¹hab⁻¹ano⁻¹ (MKANDAWIRE et al., 2004; EMBRAPA, 2006).

As doenças que ocorrem durante o ciclo da cultura são fatores limitantes da produção. Nas áreas de cultivo irrigado, como sob pivô central, as doenças são mais problemáticas, por encontrar microclima favorável. Estima-se que as perdas provocadas por doenças estejam na ordem de 10 a 25% (HALL, 1994); porém, estas muitas vezes podem chegar a valores próximos de 100%.

Várias medidas de controle, como rotação de culturas, manejo de irrigação, alteração do espaçamento, controle químico e uso de variedades resistentes são recomendadas para o controle de doenças da cultura. Em linhas gerais, o controle químico é a medida mais empregada para o controle de doenças do feijoeiro (VALE; ZAMBOLIM, 1997). Porém, o seu uso de forma indiscriminada causa efeitos adversos na saúde humana e no ambiente, o que tem ocasionado aumento das restrições legais ou comerciais ao seu uso (UTKHEDE, 1996).

Tendo em vista que as doenças limitam a produção da cultura do feijoeiro e que o controle químico é a forma mais utilizada de combatê-las, é preciso buscar alternativas para substituição ou redução do uso de agrotóxicos no sistema de manejo integrado de doenças. Assim, o controle biológico vem sendo apresentado como uma alternativa promissora (BAKER; COOK, 1974; COOK; BAKER, 1983; BETTIOL, 1991; BARGABUS et al., 2002; 2003; 2004; HALFELD-VIEIRA et al., 2004; ROMEIRO; GARCIA, 2003; ROMEIRO, et al., 2005; VIEIRA JÚNIOR, 2005). Ainda existem dificuldades, quer técnicas, quer cognitivas, desses agentes bióticos de

biocontrole, tornando-se necessárias mais pesquisas, para que, em um futuro próximo, possa-se gozar dos benefícios desse tipo de tecnologia.

Pesquisas com microrganismos procariotas têm se destacado dentro do biocontrole, quer seja pela quantidade, quer seja pelos resultados promissores. Dentre as bactérias utilizadas no controle biológico, espécies dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são as mais empregadas. O uso de *Bacillus* spp. é mais intenso, pelo fato de produzirem estruturas de resistência, endósporos que se tornam uma vantagem no processo de formulação. *Pseudomonas* spp. também tem sido muito usada, devido a sua versatilidade fisiológica.

A respeito de formulações de agentes de biocontrole existem alguns produtos disponíveis comercialmente, como Galltrol, Nogall (*Agrobacterium radiobacter*), BioYield, Companion, EcoGuard, HiStick N/T, Kodiak, Rhizo Plus, Serenade, Subtilex, YieldShield (*Bacillus* spp.), Deny, Intercept (*Burkholderia cepacia*), BioJect Spot-Less, Bio-save, BlightBan, Cedomon (*Pseudomonas* spp.), Actinovate, Mycostop (*Streptomyces* spp.) (FRAVEL, 2006).

Os trabalhos que envolvem procariotas como agentes de biocontrole são em sua maioria, realizados com bactérias que habitam a rizosfera de plantas, denominadas PGPR por Kloepper e Schroth (1978), sigla em inglês que significa rizobactérias promotoras do crescimento de plantas, porque além de atuarem como agentes de controle também ajudam melhor a capacidade de crescimento de plantas, promovendo aumento na produção (SILVA, 2002; SILVA, et al., 2004; VIEIRA JÚNIOR, 2005). Entretanto, vem crescendo o interesse por procariotas que habitam o filoplano de plantas, pois essas bactérias são capazes de promover o controle de doenças de plantas (BARGABUS et al., 2002; 2003; 2004; HALFELD-VIEIRA, 2002; HALFELD-VIEIRA et al., 2004; VIEIRA JÚNIOR, 2005). Porém, em comparação a rizobactérias, ainda são pouco pesquisadas. Conhecida a grande desses antagonistas, é portanto, necessário que haja maior atenção dos pesquisadores.

Dentro do controle biológico, um dos principais problemas refere-se a uma forma eficiente de preparo e dispensa dos antagonistas, de modo a ser facilmente utilizado pelo produtor. A maneira como os microrganismos são preparados para o uso em pesquisas, geralmente suspensão de células, é inviável para o dia-a-dia do agricultor, uma vez que é necessário o uso de estruturas sofisticadas e caras, as quais estão disponíveis apenas em centros de pesquisas. Segundo Utkhede; Smith, (1997), Vidhyasekaran et al. (1997), Bashan (1998), Moenne-Loccoz et al. (1999),

Vidhyasekaran; Muthamilan (1999), a formulação desses agentes é a melhor maneira de se resolver esse problema. Porém, o desenvolvimento de formulações é um processo caro e trabalhoso.

Garcia (2004) trabalhou na formulação de três procariotas residentes de filoplano, selecionados previamente como agentes de biocontrole de doenças do tomateiro. Cinco diferentes tipos de formulação foram testadas e nenhuma dessas foi efetiva para melhorar a dispensa dos antagonistas. O autor postula que a falta de maiores informações e experiência sobre o assunto podem ter influenciado no resultado.

É importante, portanto, aumentar o conhecimento sobre residentes de filoplano, entendendo o mecanismo de biocontrole envolvidos, ou seja como colonizam, sobrevivem e multiplicam-se no filoplano. Melhor compreensão sobre esses organismos possibilitaria que em breve produtos formulados possam ser utilizados como ferramentas na agricultura, para melhorar a produção vegetal.

Visou-se, neste trabalho, a prospecção de cinco bactérias de isolamentos UFV-172 e UFV-075 de *Bacillus cereus*, isolados do filoplano de feijoeiro e testados previamente como potenciais agentes de biocontrole da cultura (VIEIRA JÚNIOR, 2005); isolamento UFV-053 de *Pseudomonas putida* isolado da rizosfera de feijoeiro com potencial no controle de doenças (Mendonça, 2006); *B. cereus* isolamento UFV-101, isolado da rizosfera de tomateiro (SILVA, 2003); e isolamento UFV-Pp de *P. putida* isolada de filoplano de tomateiro (HALFELD-VIEIRA, 2002), no biocontrole de doenças da parte aérea do feijoeiro (mancha angular, ferrugem e crestamento bacteriano comum), bem como a capacidade desses organismos em promover o crescimento de plantas da cultura.

Referências

- Baker, K. F.; Cook, R. J. (1974). Biological control of plant pathogens. San Francisco. W. H. Freeman.
- Bargabus, R. L.; J. E. Zidack; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61: 289-298.
- Bargabus, R. L.; J. E. Zidack; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (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, R. L.; J. E. Zidack; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2004). Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control*. 30: 342-350.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of Plant growth-Promoting Bacteria for Use in Agriculture. *Biotechnology Advances*. 16: 729-770.
- Bettiol, W. (1991). Seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. In: Bettiol, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. pp. 223-236.
- Cook, R. J.; Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul. APS Press.
- Embrapa. Cultivo do Feijão Irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais: Disponível em:
<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/>. Acesso em 25 de janeiro de 2006.

Faostat. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>. Acesso em 17 de junho de 2008. 2008.

Fravel , D. R. Commercial biocontrol products available for use against plant pathogens: Disponível em: <http://www.oardc.ohio-state.edu/apsbcc/productlist.htm>. Acesso em 12 de janeiro de 2006. 2006.

Garcia, F. A. O. Efetividade de formulações de procariotas residentes de filoplano no controle biológico de doenças do tomateiro. 2004. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Halfeld-Vieira, B. A. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. 108 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Halfeld-Vieira, B. A.; Romeiro, R. S.; Mizubuti, E. S. G. (2004). Métodos de isolamento de bactérias de filoplano de tomateiro visando populações epifíticas e implicações como agentes de biocontrole. *Fitopatologia Brasileira*. 29: 638-643.

Hall, R. E. *Compendium of Bean Diseases*. (1994). St. Paul. APS Press.

Kloepper, J. W.; Schroth, M. M. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: international conference on plant pathogenic bacteria, 4, 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: 8. pp.879-882.

Mendonça, H. L. Seleção de rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de resistência em feijoeiro. 2006. 67f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Mkandawire, A. B. C.; Mabagala, R. B.; Guzmán, P.; Gepts, P.; Gilbertson, R. L. (2004). Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology*. 94: 593-603.

Moenne-Loccoz, Y.; Naughton, M.; Higgins, P.; Powell, J. (1999). Effect of inoculum preparation and formulation on survival and biocontrol efficacy of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Applied Microbiology*. 86: 108-116.

Romeiro, R. S.; Filho, R. L.; Vieira Junior, J. R.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C.; Carvalho, M. G. (2005). Macromolecules Released by a Plant Growth-promoting Rhizobacterium as Elicitors of Systemic Resistance in Tomato to Bacterial and Fungal Pathogens. *Journal of Phytopathology*. 153: 120–123.

Romeiro, R. S.; Garcia, F. A. O. (2003). Controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 11: 195-227.

Silva, H. S. A. Rizobactérias como promotoras do crescimento de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares da cultura. 2002. 115 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Silva, H. S. A.; Deuner, C. C.; Romeiro, R. S. (2004). Crescimento de tomateiro avaliado após aplicação de rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Summa Phytopathologica*. 30: 281-283.

Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S.; Mounteer, A. (2003). Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. *Journal of Phytopathology*. 151: 42-46.

Utkhede, R. S.(1996). Potential and problems of developing bacterial biocontrol agents. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 18: 455-462.

Utkhede, R. S.; Smith, E. M. (1997). Effectiveness of dry formulations of *Enterobacter agglomerans* of control of crown and root rot of apple trees. *Canadian Journal of Plant Pathology*.19: 397-401.

Vale, F. X. R.; Zambolim, L. (1997). Controle de doenças de plantas - Grandes culturas. Viçosa. UFV Departamento de Fitopatologia

Vidhyasekaran, P.; Muthamilan, M. (1999). Evaluation of a powder formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pfl for control of rice sheath blight. *Biocontrol Science and Technology*. 9: 67-74.

Vidhyasekaran, P.; Sethuraman, K.; Rajappan, K.; Vasumathi, K. (1997). Powder formulations of *Pseudomonas fluorescens* to control pigeonpea wilt. *Biological Control*. 8: 166-171.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

CAPÍTULO 1

Biocontrole do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) por Procariotas em Condições de Casa de Vegetação.

Resumo

Dentre as várias doenças que limitam a produção de feijão no Brasil, o crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), é uma das mais importantes. Além da agressividade do patógeno em condições favoráveis, é de difícil controle químico e cultural. Assim, o controle biológico torna-se uma alternativa para as medidas de manejo da cultura. Em geral, os agentes de biocontrole utilizados são isolados de um *habitat* ou de uma espécie de planta e dispensados nesse *habitat* e, ou, nessa planta. Nesse trabalho, tentou-se não apenas confirmar a efetividade de agentes de biocontrole bem como estudar se a origem dos agentes de biocontrole, tanto com relação ao *habitat*, quanto no que se refere à planta de origem, poderiam interferir no controle. Para isso, cinco bactérias pré-selecionadas (*Bacillus cereus* UFV-172 e UFV-75 isoladas de filoplano de feijoeiro; *Pseudomonas putida* UFV-053 isolada de rizosfera de feijoeiro; *B. cereus* UFV-101, isolada de rizosfera de tomateiro; e *P. putida* UFV-Pp, isolada de filoplano de tomateiro), foram atomizadas em plantas de feijoeiro cultivadas em casa de vegetação. Posteriormente, essas plantas foram inoculadas com o patógeno desafiante (*Xap*). O ensaio foi repetido no tempo, em 10 épocas diferentes. Os cinco antagonistas reduziram a severidade da doença em comparação com o controle, que consistiu em plantas tratadas com água. Pode-se, portanto, concluir que não houve relação entre origem, seja quanto ao *habitat*, seja quanto à planta da qual foram isolados os antagonistas, e a efetividade do biocontrole do crestamento bacteriano comum, exercido por eles.

Biocontrol of common bacterial blight of bean (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) in green house by prokaryotes

Abstract

Among several yield-limiting diseases in bean crop, the bacterial blight induced by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) is one of the most important. Besides pathogen aggressiveness under favorable environmental conditions, disease control is difficult either by chemical or cultural measures and consequently, the biological control turns into a good alternative. Usually biocontrol agents are isolated from a given *habitat* or plant and delivered to the same *habitat* or host. In this work we aimed not only to confirm effectiveness of biocontrol agents under investigation as well investigate whether delivery mode and origin of the isolates might interfere with their efficiency. Therefore, five bacteria previously selected as biocontrol agents for bean diseases UFV-172 and UFV-75 isolated from bean phylloplane; UFV-053 isolated from bean rhizosphere ; UFV-101 isolated from tomato rhizosphere and UFV-Pp isolated from tomato phylloplane –were delivered to bean plants in a greenhouse and later, inoculated with the challenging pathogen (*Xap*) being the assay done over ten times along an year. The five biocontrol agents were always able to promote control, in all instances, regardless their origin in terms of host and *habitat*.

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão; porém, em termos de produtividade, o país ocupa apenas o 66º lugar (FAOSTAT, 2008). Além da baixa tecnificação na cultura em grande parte do país, as doenças que afetam o feijoeiro são um dos fatores que contribuem para essa baixa produtividade (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Dentre as doenças que atacam a cultura, o crestamento bacteriano comum do feijoeiro causado por *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* (Smith) Vauterin, Hoste, Kersters e Swings 1995 é uma das principais (MKANDAWIRE et al., 2004), podendo levar a danos severos na cultura sob condições favoráveis. Segundo Saettler (1989) citado por Vidaver (1993) as perdas podem chegar à ordem de 45%.

O manejo da doença, em geral, é difícil. O controle químico com fungicidas apresenta baixa eficácia e é economicamente inviável (MARINGONI, 1990). A obtenção de cultivares resistentes é difícil devido à alta variabilidade do patógeno (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Assim, é necessário buscar medidas de manejo que visem reduzir os danos causados pelo crestamento bacteriano comum, medidas que, além do controle, sejam menos impactantes ao ambiente e que tragam menos riscos à vida humana. Nesse contexto, o controle biológico é considerado uma das mais promissoras medidas de manejo de doenças de plantas (ROMEIRO, 2007a).

Bactérias são os organismos mais utilizados como agentes de controle biológico, sejam rizobactérias, endófitas ou residentes de filoplano. Em geral, são aplicadas conforme o local de seu isolamento e, comumente, na mesma espécie de plantas que foram isoladas.

Este trabalho teve como objetivo confirmar a efetividade de bactérias agentes de biocontrole, previamente selecionadas, e averiguar se a origem, quanto ao *habitat* e quanto à planta do qual foram isoladas, poderia interferir de alguma forma na eficácia do controle.

Material e Métodos

Microrganismos, sua origem e cultivo

Os microrganismos utilizados pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV. Como antagonistas utilizaram-se

três isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172 e Ufv-075) isolados de filoplano de feijoeiro (VIEIRA JÚNIOR, 2005), Ufv-101 isolado de rizosfera de tomateiro (SILVA et al., 2003) e dois isolamentos de *Pseudomonas putida* (UFV-Pp isolado de filoplano de tomateiro) (HALFELD-VIEIRA, 2002) e Ufv-053 isolado de rizosfera de feijoeiro (MENDONÇA, 2006). Como patógeno desafiante, utilizou-se *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*). Todas as culturas foram cultivadas no meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), e, posteriormente, preservadas por repicagem tubo-a-tubo e sob óleo mineral (ROMEIRO, 2007b).

Preparo da suspensão de propágulos dos microrganismos

Os cinco antagonistas foram cultivados em meio 523 sólido, por 20 horas, a 28 °C, coletados com o auxílio de alça de Drygalski e suspensos em água com sua concentração ajustada para densidade óptica de 0,4 a 540 nm. *Xap* foi cultivada em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) sólido, por 32 horas a 28 °C. Após, os propágulos do patógeno foram suspensos em água e a concentração, ajustada ($OD_{540nm} = 0,4$).

Biocontrole em casa de vegetação

Plantas de feijoeiro cultivar Pérola foram cultivadas em vasos plásticos de 500 mL, contendo terriço não esterilizado e mantidos em casa de vegetação, sendo duas plantas por vaso. Quando se encontravam com a terceira folha verdadeira, correspondente ao estágio vegetativo quatro (V4), da escala proposta por Fernández et al. (1985) citados por Santos e Gavilanes (2006), tiveram seu filoplano atomizados com as suspensões de propágulos dos antagonistas. Após quatro dias, as plantas foram levadas para câmara de nebulização com temperatura ajustada para 28 °C, e umidade relativa de 100%. Transcorrido as 48 horas, as plantas foram inoculadas, por atomização, com uma suspensão de células de *Xap* e, posteriormente, levadas para a casa de vegetação. Aguardou-se o aparecimento dos sintomas e, sete dias após o seu surgimento, obtiveram-se, por meio de uma câmera digital, imagens das folhas lesionadas. Essas imagens foram processadas utilizando-se software Quant (Vale et al, 2004), obtendo-se a percentagem de área foliar doente.

O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com 10 repetições por tratamento, tendo como controle plantas que tiveram seu filoplano

pulverizado com água. O ensaio foi repetido 10 vezes no tempo, dos meses de fevereiro a dezembro de 2007. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o software Saeg®.

Resultados e Discussão

As cinco bactérias testadas reduziram consideravelmente a severidade do crestamento bacteriano comum (Tabela 1).

A avaliação da severidade média de doença por planta permite concluir, pelo menos nas condições em que foi realizado esse experimento, que a eficácia do antagonista não está relacionada à sua origem, quer seja pelo hospedeiro, quer seja do *habitat* do qual foi isolado. Somente em dois dos 10 ensaios realizados, um dos isolamentos testados não diferiu significativamente do controle. O controle exercido pelos isolamentos UFV-172 e UFV-075 era esperado, uma vez que estes são autóctones do filoplano de feijoeiro e em trabalhos anteriores, controlaram a doença em condições de casa de vegetação (VIEIRA JÚNIOR, 2005). Para o isolamento UFV-053 (*P. putida*), embora isolado da rizosfera de feijoeiro e ter reduzido a severidade de *Xap* em plantas oriundas de sementes microbiolizadas com seus propágulos (MENDONÇA, 2006), ainda não se conhecia o seu potencial de controlar a doença quando dispensado em um *habitat* diferente, como o filoplano. A bactéria só não reduziu a severidade da doença em dois ensaios, ou seja 5 e 6 (Tabela 1). Esses dois ensaios foram conduzidos durante o inverno de 2007, quando as temperaturas foram baixas e, embora tenham sido realizados em casa de vegetação, esta não possui sistema de aquecimento, somente de arrefecimento. Nessas condições, houve porcentagem muito baixa de área foliar lesionada, possivelmente em rezação de a temperatura não ter sido favorável ao estabelecimento do patógeno, o qual requer temperaturas elevadas (VIDAVER, 1993; PEREIRA, 2003). Assim, se forem estabelecidas comparações com os resultados dos outros oito ensaios (Tabela 1), é possível que a ausência de controle na verdade seja uma baixa severidade do crestamento bacteriano comum a níveis tais que não se permitia diferir significativamente entre o tratamento controle e UFV-053. Zanatta et al. (2007), em um trabalho realizado com cinco isolamentos bacterianos, isolados de rizosfera ou filoplano de feijoeiro, observaram que, independentemente do local onde haviam sido isolados, todos mostraram ser eficientes em reduzir a severidade do crestamento bacteriano comum em folíolos da cultura. Carrer Filho (2002), ao atomizar plantas de tomate com actinobactérias isoladas de rizosfera de tomateiro, verificou

redução no progresso de pinta preta, causada por *Alternaria solani*, em condições de campo. Os resultados desses trabalhos estão de acordo com os aqui observados, podendo-se admitir que um microrganismo pode atuar como agente de biocontrole em uma região da planta que não seja aquela da qual foi isolado.

Os isolamentos UFV-101 e UFV-Pp são oriundos de tomateiro, rizosfera e filoplano, respectivamente, e eficientes em controlar patógenos do tomateiro (HALFELD-VIEIRA, 2002; SILVA et al., 2003). Aqui se relata pela primeira vez a utilização desses organismos para o controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro. Os dois isolamentos reduziram a severidade da doença em condições de casa de vegetação, quando dispensados por atomização no filoplano de plantas da cultura (Tabela 1). Há poucos relatos na literatura do uso de um agente de biocontrole selecionado em uma cultura e utilizado em outra. Em um trabalho realizado com cacau, dois isolamentos de *B. cereus*, BP24 e BT8, oriundos de batata e tomate, respectivamente, colonizaram o filoplano e controlaram a severidade da doença incitada por *Phytophthora capsici* (MELNICK et al., 2008), o que está de acordo com aos resultados observados neste trabalho, mostrando assim que bactérias isoladas de uma cultura podem ser utilizadas para o biocontrole de outra. Talvez isso se explique pelo fato das bactérias serem organismos fisiologicamente muito versáteis (NEIDHARDT et al., 1990; ATLAS; BARTHA, 1997). Assim, possuem capacidade de se adaptar a outros ambientes. Pode-se usar o exemplo de bactérias fitopatogênicas, que possuem a capacidade de se adaptarem na ausência do hospedeiro principal, parasitando hospedeiros alternativos, ou sobreviver em seu filoplano, como organismos residentes (HIRANO; UPPER, 1983; ROMEIRO, 2005; PEIXOTO et al., 2007). Dessa forma, bactérias antagonistas também poderiam colonizar outros hospedeiros.

Referências

Atlas, R. M.; Bartha, R. (1998). *Microbial Ecology: Fundamentals e applications*. 4th Ed. Massachusetts. Benjamin Cummings.

Carrer Filho, R. Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Faostat. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567>. Acesso em 17 de junho de 2008. 2008.

Halfeld-Vieira, B. A. H. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. 108 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Hirano, S. S.; Upper, C. D. (1983). Ecology and epidemiology of foliar bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 21:243-69.

Kado, C. I.; Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-979.

Maringoni, A. C. (1990). Controle químico do crestamento bacteriano comum do feijoeiro e seu efeito na transmissão de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye pelas sementes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 25: 1151-1156.

Melnick, R. L.; Zidack, N. K.; Bailey, B. A.; Maximova, S. N.; Gultinan, M.; Backman, P. A. (2008). Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control*. 46: 46-56.

Mendonça, H. L. Seleção de rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de resistência em feijoeiro. 2006. 67 f Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Mkandawire, A. B. C.; Mabagala, R. B.; Guzmán, P.; Gepts, P.; Gilbertson, R. L. (2004). Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology*. 94: 593-603.

Neidhardt, F. C.; Ingraham, J. L.; Schaechter, M. (1990). *Physiology of the bacterial cell: A molecular approach*. Massachusetts. Sinauer Associates Inc.

Paula Júnior, T. J.; Zamblim, L. Doenças (2006). In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds). *Feijão*. 2^{ed}. pp.359-414.

Peixoto, A. R., Mariano, R. L. R., Moreira, J. O. T.; Viana, I. O. (2007). Hospedeiros alternativos de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. *Fitopatologia Brasileira* 32:161-164.

Pereira, J. L. A. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro: patologia de sementes e dinâmica temporal de epidemias. 2003. 44 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Romeiro, R. S. (2005). *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S.(2007a). *Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos*. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S. (2007b). *Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos*. Viçosa. Editora UFV.

Santos, J. B.; Gavilanes, M. L. (2006). Botânica. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds). *Feijão*. 2^{ed}. pp.41-66.

Silva, H. S. A., Romeiro, R. S.; Mounter, A.(2003). Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. *Journal of Phytopathology*. 151: 42-46.

Vale, F. X. R.; Fernandes Filho, E. R.; Liberato, J. R. (2004). QUANT - a Software for plant disease severity assessment. In: Roy E. Gaunt Memorial Workshop on Disease and Crop Loss Assessment. Christchurch.

Vidaver, A. K. (1993). *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: cause of common bacterial blight of bean. In: Swings, J.G.; Civerolo, E.L. (Eds). *Xanthomonas*. 1993. pp.40-44.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Zanatta, Z. G. C. N.; Moura, A. B.; Maia, L. C.; Santos, A. S. (2007). Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:511-515.

Tabela 1 – Severidade média de cretamento bacteriano comum em plantas de feijoeiro cultivadas em casa de vegetação expostas a cinco antagonistas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey ($P = 0,05$).

Ensaio	Tratamento	Severidade(%)	
Ensaio 1 (Fevereiro/2007)	Controle	8,2283	A
	UFV-101	1,784	B
	UFV-PP	0,7383	B
	UFV-053	0,51	B
	UFV-075	0,165	B
	UFV-172	0,0917	B
Ensaio 2 (Março/2007)	Controle	7,9	A
	UFV-101	1,59	B
	UFV-PP	0,695	B
	UFV-075	0,5283	B
	UFV-053	0,4967	B
	UFV-172	0,3017	B
Ensaio 3 (Abril/2007)	Controle	2,43	A
	UFV-PP	0,8333	B
	UFV-172	0,8267	B
	UFV-075	0,825	B
	UFV-053	0,76	B
	UFV-101	0,2917	B
Ensaio 4 (Maio/2007)	Controle	13,1017	A
	UFV-053	6,15	B
	UFV-101	2,095	C
	UFV-075	1,7567	C
	UFV-PP	1,1217	C
	UFV-172	0,695	C
Ensaio 5 (Junho/2007)	Controle	3,272	A
	UFV-053	1,962	Ab
	UFV-075	0,984	B
	UFV-101	0,662	B
	UFV-PP	0,51	B
	UFV-172	0,442	B
Ensaio 6 (Julho/2007)	Controle	4,1933	A
	UFV-053	2,7933	Ab
	UFV-075	1,2633	B
	UFV-101	1,0717	B
	UFV-PP	0,5833	B
	UFV-172	0,5517	B

Tabela 1 – Continuação...

Ensaio 7 (Setembro/2007)	Controle	3,2417	A
	UFV-PP	0,8767	B
	UFV-101	0,8757	B
	UFV-053	0,8233	B
	UFV-172	0,6919	B
	UFV-075	0,4867	B
Ensaio 8 (Outubro/2007)	Controle	6,6783	A
	UFV-053	2,1783	B
	UFV-101	1,645	B
	UFV-172	1,0267	B
	UFV-075	0,97	B
	UFV-PP	0,9383	B
Ensaio 9 (Novembro/2007)	Controle	11,8883	A
	UFV-101	1,784	B
	UFV-172	1,21	B
	UFV-PP	1,005	B
	UFV-053	0,51	B
	UFV-075	0,21	B
Ensaio 10 (Dezembro/2007)	Controle	10,8717	A
	UFV-101	1,59	B
	UFV-PP	0,695	B
	UFV-075	0,5283	B
	UFV-053	0,4967	B
	UFV-172	0,3017	B

UFV-075, UFV-101 e UFV-172 = *Bacillus cereus*

UFV-053 e UFV-Pp = *Pseudomonas putida*

Severidade% = % de área foliar lesionada

CAPÍTULO 2

Indução de Resistência em Plantas de Feijoeiro pela Dispensa de Cinco Procariotas em seu Filoplano

Resumo

A indução de resistência em plantas a patógenos é um fenômeno já bastante conhecido, principalmente tendo como eliciadores ativadores químicos e rizobactérias. Porém, o conhecimento da existência de residentes de filoplano como indutores de resistência em plantas é recente. Objetivou-se neste trabalho avaliar o aumento, nos tecidos de plantas, da atividade de cinco enzimas indicadoras do estado de indução, a saber: lipoxigenases, fenilalanina-amônia liase, β -1,3-glucanases, peroxidases e quitinases. Para tanto, plantas de feijão tiveram seu filoplano exposto a três isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101 e UFV-075) e, posteriormente, inoculadas com *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*). Folhas dessas plantas foram coletadas em três períodos diferentes (48, 96 e 288 horas após a exposição aos antagonistas) e, posteriormente, utilizadas para a extração das enzimas indicadoras do estado de indução, que foram avaliadas por métodos espectrofotométricos. Verificou-se, pela avaliação dos extratos vegetais, que não houve aumento da atividade enzimática de lipoxigenase e quitinase em nenhum dos tratamentos. Os isolamentos UFV-172, UFV-101 e UFV-075 foram capazes de provocar aumento na atividade de pelo menos uma das três enzimas restantes. Verificou-se também que na presença de *Xap*, a planta não foi capaz de expressar a atividade dessas enzimas.

Induction of resistance in bean plants after delivering five prokaryotes to the phylloplane

Abstract

Induction of resistance in plants to pathogens is a well known phenomenon, mainly in the case of chemical activators and rhizobacteria. However, phylloplane residents as inducers of resistance in plants is a recent discovery. This paper aimed to quantify increases of the activity of five enzymes known as indicators of the induced state in bean plant tissue, namely lipoxygenases, phenylalanine-ammonia-lyases, β -1,3-glucanases, peroxidases e chitinases. For this purpose, bean plants had their phylloplane exposed to three isolates of *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101 e UFV-075) and, later, they were inoculated with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*). Forty eight, 96 and 288 hours after exposure, leaves were harvested for enzyme extracting procedures following quantification of activity by spectrophotometry protocols. Leaf extract analysis showed no increase in the activity of both lipoxygenases and chitinases in the case of any treatment. Nevertheless, isolates UFV-172, UFV-101 and UFV-075 were able to bring about increases in the activity of at least one out of the remaining enzymes investigated. Moreover, it was observed that in the presence of *Xap* the plant was not able to express the activities of the aforementioned enzymes.

Introdução

Indução de resistência de plantas a patógenos pode ser considerada como o aumento da capacidade defensiva de uma planta quando corretamente estimulada (VAN LOON ET AL., 1998), quando esses estímulos podem ser por meio de microrganismos vivos (LIU et al., 1995; BARGABUS et al., 2002; 2003; 2004; SILVA et al., 2004), extrato de células (Leeman et al., 1995; Romeiro e Kimura, 1997; Mauch-Mani e Métraux, 1998), por um agente químico (FRIEDRICH et al., 1996; KUNZ et al., 1997), ou por moléculas sintetizadas por microrganismos (ROMEIRO et al., 2005). Essa resistência induzida raramente leva ao controle completo; porém reduz o número e o tamanho das lesões (HAMMERSCHMIDT, 1999; WALTERS et al., 2005), podendo ser local ou sistêmica, tendo ainda ação sobre múltiplos patógenos (PIETERSE et al., 2000).

O fenômeno da indução de resistência é dividido em duas categorias: A Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) vem sendo caracterizada como sendo dependente de rotas envolvendo o ácido salicílico e o acúmulo de proteínas PR (PIETERSE et al., 1998; VAN LOON et al., 1998; MÉTRAUX, 2001). Em geral, quando SAR é o mecanismo envolvido na resistência induzida, a planta sofre alterações citológicas e histológicas, como necroses. Geralmente, os eliciadores de SAR são patógenos ou ativadores químicos (MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1998; HAMMERSCHMIDT, 1999; WALTERS et al., 2005). A Resistência Sistêmica Induzida (ISR) vem sendo caracterizada como aquela em que não há acúmulo de proteínas PR, não há dependência de rotas envolvendo ácido salicílico, a sinalização envolve jasmonatos e etileno, nenhuma alteração é observada na planta, e o agente indutor é usualmente um microrganismo não-patogênico (STICHER ET AL., 1997; PIETERSE et al., 1998; VAN LOON et al., 1998).

São inúmeros os relatos de rizobactérias induzindo resistência em plantas; porém, bactérias residentes de filoplano como indutoras de resistência é um fato recente (BARGABUS et al., 2002; 2003; 2004; HALFELD-VIEIRA et al., 2006). Bargabus et al. (2002), relataram pela primeira vez a indução de resistência em plantas a patógenos por residentes de filoplano, quando um isolamento BacJ de *Bacillus mycoides* foi capaz de controlar *Cercospora beticola*. Nesse trabalho, os autores observaram o aumento da atividade enzimática de β -1,3-glucanase, peroxidases e quitinases, e ausência de antagonismo direto por parte do isolamento BacJ ao patógeno. Halfeld-Vieira et al.

(2006) observaram a indução de resistência em tomateiro por isolamentos bacterianos residentes de filoplano. Os autores observaram o aumento na atividade de enzimas indicadoras do estado de indução em que tiveram seus filoplanos expostos ao antagonista UFV-IEA6, um isolamento de *Bacillus cereus*. Em um trabalho realizado para o controle biológico de vassoura-de-bruxa do cacau, causado por *Moniliophthora perniciosa*, o aumento da atividade de algumas enzimas foi observado, em plantas expostas a actinobactérias isolados do filoplano de plantas de cacau. Quando mudas de cacau foram expostas a dois isolamentos de actinobactéria, observou-se que essas plantas apresentavam as atividades de algumas enzimas indicadoras do estado de indução aumentadas (Macagnan et al., 2008).

Objetivou-se neste trabalho avaliar a indução de resistência em plantas de feijoeiro que tiveram seu filoplano exposto a três procariotas previamente selecionados como agentes de biocontrole, pelo aumento da atividade de enzimas indicadoras do estado de indução nos tecidos do hospedeiro.

Material e Métodos

Material vegetal e tratamentos

Plantas de feijão cultivar Pérola foram cultivadas em vasos de 500 mL, contendo terriço não esterilizado e mantidos em casa de vegetação, com uma planta por vaso, até a terceira folha verdadeira, correspondente ao estágio vegetativo quatro (V4) da escala proposta por Fernández et al. (1985), citados por Santos e Gavilanes (2006). Aplicaram-se então os tratamentos: a) atomização de propágulos dos antagonistas UFV-172, UFV-101 e UFV-075 (*Bacillus cereus*), obtidos de cultivo em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), sólido, 24 horas a 28 °C, e, posteriormente, suspensos em água e com concentração ajustada para 0,4 em OD540 nm; b) atomização de propágulos dos antagonistas e, após quatro dias, inoculação com propágulos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), obtidos de cultivo em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), sólido, 24 horas a 28 °C, e, posteriormente, suspensos em água e com concentração ajustada para 0,4 em OD540 nm; c) atomização de propágulos de *Xap*; e d) plantas atomizadas com água. Para cada tratamento foram utilizadas nove plantas, divididas em três subgrupos. O primeiro subgrupo foi constituído de plantas que tiveram a parte aérea (folhas e caules) coletada aos dois dias após a dispensa dos antagonistas; o

segundo subgrupo, de plantas que tiveram a parte aérea coletada aos quatro dias após a exposição aos antagonistas; e o terceiro subgrupo, de plantas que tiveram a parte aérea coletada aos 12 dias após a atomização dos antagonistas. Realizadas as coletas, o material vegetal era envolvido em papel alumínio e, em seguida, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C, até o momento da análise enzimática. O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por tratamento.

Preparo do extrato vegetal

Cerca de três gramas de amostra do tecido vegetal (caules e folhas) foram trituradas em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo, adicionando-se ao macerado 7,5 mL de uma solução-tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, dois inibidores de protease (benzamidina 450 µL de uma solução-estoque 50 mM e fluoreto de fenilmetilsulfonila-PMSF 450 µL de uma solução-estoque 50 mM) e 0,15 g de polivinilpirrolidona-PVP. Centrifugou-se então o preparado (THERMO, JUAN MR5) a 20000 g/15 min, a 4 °C, sendo o sobrenadante coletado e colocado em banho gelado (BARACAT-PEREIRA et al., 2001).

Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), ajustando-se a curva-padrão com BSA (albumina sérica bovina) 0, 50, 100, 150 mg/mL) em OD 545 nm (BRADFORD, 1976). Os dados foram expressos em mg de proteínas por grama de tecido.

Deteção de atividade de lipoxigenase

Detectou-se a atividade de lipoxigenase pelo método de Axelrod et al. (1981), pela quantificação em espectrofotômetro (OD 234 nm) de ligações duplas conjugadas no hidroperóxido formado, pela ação desta enzima sobre o ácido linoléico (PORTA; ROCHA-SOSA, 2002), usando como substrato o linoleato de sódio 10 mM, pH 9,0. A reação foi montada com 1000 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 20 µL de

linoleato de sódio e 10 µL de extrato vegetal. O ensaio foi incubado a 25 °C em banho-maria e, posteriormente, procederam-se às leituras em espectrofotômetro nos tempos: 30 segundos e 10 minutos e 30 segundos após o início da reação, calculando-se a velocidade de formação dos produtos (V) pela equação:

$$V = \frac{\Delta A_{234}}{\epsilon \cdot l \cdot \Delta t}$$

em que o coeficiente de extinção molar (ϵ) dos hidroperóxidos para o ácido linoléico é 25000/M.cm (AXELROD et al., 1981), o caminho óptico (l) é 1,0 cm e o Δt corresponde ao tempo de reação.

Os resultados finais foram expressos em atividade específica ($\mu\text{mol ácido linoléico} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \mu\text{g de proteína}^{-1}$). Como controle, utilizou-se solução composta de 21 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, 420 µL de linoleato de sódio.

Detecção de atividade de β -1,3-glucanase

A atividade de β -1,3-glucanase foi determinada pelo teste espectrofotométrico, determinando-se a glicose liberada da laminarina como substrato, após o uso da hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzóico (HAPHB) (LEVER, 1972). O ensaio constituiu de 220 µL de solução-tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0, 250 µL do substrato laminarina 4 mg.mL⁻¹ e 30 µL de extrato vegetal, incubando-se a 45 °C, por 60 minutos. Posteriormente, acrescentou-se a solução de desenvolvimento de cor, constituída de 1500 µL de HAPHB (0,500g HAPHB em 10 mL de HCl 0,5 M, acrescida de 50 mL de NaOH 0,5M), aquecendo-se em banho-maria a 100 °C, por 5 minutos. Em seguida, resfriou-se a 30 °C, procedendo-se às leituras em espectrofotômetro a 410 nm. O controle foi feito com amostras sem incubação prévia a 45 °C, por 1 hora. Os resultados foram expressos em atividade específica ($\Delta\text{Abs} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \mu\text{g de proteína}^{-1}$).

Detecção de atividade de fenilalanina-amônia liase

A atividade da enzima fenilalanina-amônia liase foi quantificada por espectrofotometria em densidade óptica de 290 nm, após a conversão da L-fenilalanina, em ácido *trans*-cinâmico. O ensaio, montado segundo metodologia desenvolvida por Pascholati et al. (1986), com alterações, constituiu de 1000 µL de solução de L-

fenilalanina 0,2% (p/v) e 10 µL do extrato vegetal. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C, sendo as leituras feitas em 0,5 minutos e 5,5 minutos após o início da reação. As variações das absorvâncias no período foram transformadas em nmol de ácido *trans*-cinâmico pela equação da reta obtida da curva-padrão do ácido *trans*-cinâmico (SILVA, 2002).

$$\text{Abs} = 0,362 (\text{nmol de ácido } \textit{trans} - \textit{cinâmico}) - 0,389$$

Os resultados foram expressos pela atividade específica (nmol de ácido *trans*-cinâmico. minuto⁻¹.µg de proteína⁻¹). O controle foi constituído de solução de 1010 µL de L-fenilalanina a 0,2% (p/v).

Deteccção de atividade de peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada pela metodologia proposta por Hammerschmidt et al. (1982), com adaptações, em que 1015 µL do substrato (125 µL de guaiacol, 135 µL de peróxido de hidrogênio e 50 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM pH 6,0) e 5 µL do extrato vegetal compuseram a mistura de reação. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 30 °C e, nos tempos 30 segundos e 15 minutos e 30 segundos após o início da reação, procedeu-se à leitura das absorvâncias (OD 470 nm) em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U3000). Os resultados foram expressos em atividade específica ($\Delta\text{Abs}.\text{minuto}^{-1}.\mu\text{g de proteína}^{-1}$), em que o resultado da variação da absorvância (ΔAbs) foi dividido pelo tempo de 15 minutos e, posteriormente, pela quantidade de proteína em 1 µL do extrato vegetal. Como controle foram utilizados 1020 µL do substrato .

Deteccção de atividade de quitinase.

A atividade de quitinase foi determinada pelo método adaptado de Thompson et al. (2001), em que se quantifica, por espectrofotometria, o Remazol Violeta Brilhante liberado pela Chitin Azure (SIGMA). A reação foi composta de 10 mg de Chitin Azure,

600 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 e 400 µL de extrato vegetal. Incubou-se a mistura de reação a 25 °C, por 48 horas, sendo as leituras das absorbâncias (OD 575 nm) realizadas nos tempos de 10 minutos e 48 horas e 10 minutos após o início da reação. Antes da leitura, a reação foi centrifugada a 14500 rpm por 10 minutos em centrífuga Eppendorf, modelo Mini Spin Plus. Como controle, utilizou-se uma mistura de 10 mg de Chitin Azure, 1000 µL de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0. Os resultados foram expressos em atividade específica (atividade de quitinase.dia⁻¹.µg de quitina⁻¹. µg de proteína⁻¹).

Biocontrole em casa de vegetação.

Plantas de feijoeiro cultivar Pérola foram cultivadas em vasos de 500 mL, contendo terriço não esterilizado e, quando se encontravam no estágio V2 (folhas monofolioladas completamente desenvolvidas), foram cuidadosamente retiradas do vaso e o sistema radicular cuidadosamente lavado em água corrente. Após, o sistema radicular de cada planta foi imerso em suspensão de propágulos dos três antagonistas (UFV-172, UFV-101 e UFV-075) com concentração ajustada para OD_{540nm} = 0,4, por 12 horas e novamente transplantadas para os mesmos vasos. Vinte dias depois do transplante, as plantas foram levadas para câmara de nebulização a 25 °C, por dois dias, sendo então inoculadas por aspersão com o patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e levadas de volta à casa de vegetação. Após o surgimento dos sintomas, avaliou-se a severidade de doença com o auxílio do programa Quant (VALE et al., 2004). O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com doze repetições por tratamento.

Resultados e Discussão

A concentração de proteínas totais foi maior que a do controle para todos os tratamentos, à exceção de UFV-075 e UFV101, no tempo 48 horas, e para o tratamento UFV-172 em 288 horas, em que não diferiram estatisticamente do controle (Figura 1).

Não foi observada a maior atividade de lipoxigenase do que no controle em nenhum dos tratamentos (dados não apresentados). Contudo, esperava-se que plantas

tratadas com o isolamento UFV-101 de *B. cereus* apresentassem aumento da atividade dessa enzima, o que já havia sido relatado para o tomateiro (SILVA et al., 2004).

O aumento da atividade de β -1,3-glucanase foi observado para os tratamentos UFV-101 e UFV-075, 96 horas após a exposição ao eliciador. O decréscimo da enzima em todos os casos foi observado no tempo 288 horas após a exposição ao eliciador, porém, à exceção dos tratamentos de *Xap* e UFV-101, a redução foi menor que a do tratamento controle. Isso indica que os antagonistas conseguem manter algum nível de expressão da enzima, mesmo um longo tempo depois da eliciação (Figura 2). É possível que a redução da atividade de β -1,3-glucanase após 12 dias se dê ao custo para a planta da manutenção da síntese da enzima por um longo período, uma vez que a síntese dessa enzima e de outras relacionadas à indução de resistência acarreta custos energéticos para a planta. Em condições naturais, a resistência induzida somente é expressa na presença do patógeno, de modo que a planta não necessite alocar recursos desnecessariamente (HEIL, 2002). Assim, uma vez que *Xap* não possui β -1,3-glucano em sua composição celular, tornou-se desnecessário para a planta a manutenção da síntese de β -1,3-glucanase, não sendo possível determinar se a população do antagonista, a 288 horas após a dispensa no filoplano, está em concentração suficiente para eliciar a síntese da enzima. Quando o patógeno possui β -1,3-glucano em sua composição, à medida que fragmentos desse polímero são liberados, ele atua como eliciador e a planta, sintetiza a enzima (MENDGEN Et al., 1985).

Normalmente, o aumento da atividade dessa enzima é observado quando plantas são expostas a patógenos fúngicos (XUE et al, 1998) ou então a ativadores químicos, como ácido salicílico (ATHAYDE SOBRINHO et al, 2006; STICHER et al, 1997; VAN LOON et al., 1998). Porém, ainda não estão totalmente elucidadas as rotas envolvidas na síntese dessas enzimas e a diferenciação em rotas envolvidas com jasmonatos e etileno e rotas envolvidas com ácido salicílico é meramente didática (ANDERSON et al., 2006). Assim, é possível, como mostrado neste trabalho, que uma enzima seja eliciada por um ativador que não seja comumente relatado. Bargabus et al. (2002) também observaram que isolamentos de *B. mycooides* alteravam a atividade de β -1,3-glucanase em beterraba-açucareira, quando as plantas tinham o seu filoplano exposto ao antagonista.

Alterações na atividade de fenilalanina-amônia liase foram observadas no tratamento UFV172, 96 e 288 horas após a aplicação do antagonista e, para UFV-75,

288 horas após a sua aplicação (Figura 3). O aumento de fenilalanina-amônio liase em feijoeiro já foi observado em plantas que tiveram a sua rizosfera colonizada por antagonistas (MEYER et al., 1999), mas o fato ainda não havia sido relatado pela ação de antagonistas, no filoplano de plantas da cultura. É interessante mencionar que o acúmulo dessa enzima nos tecidos vegetais pode favorecer a planta. Fenilalanina-amônia liase é uma importante enzima atua na rota de fenilpropanóides, sendo vários destes compostos relacionados à resistência de plantas, como flavanóides, lignina, fitoalexinas, além de moléculas envolvidas na sinalização da resistência (CAVALCANTI et al., 2006; HEIL, 2007; TAIZ et al., 2004). Isso implica que a planta, do ponto de vista bioquímico e estrutural, torna-se mais apta a se defender do patógeno desafiante.

Plantas tratadas com o isolamento UFV-101 tiveram a atividade de peroxidase aumentada nos tecidos avaliados, 96 horas após a aplicação do antagonista e, nas tratadas com UFV-075 e UFV-172, após 288 horas da aplicação (Figura 4). Peroxidases são componentes da resposta inicial da defesa de plantas contra o ataque de patógenos (TUZUN, 2001). Relacionam-se diretamente “explosão oxidativa” (MARTINEZ et al., 1998; WOJTASZEK, 1997). Este fenômeno contribui para uma rápida produção de espécies reativas de oxigênio (MARTINEZ et al., 1998; NEILL *et al.*, 2002), que atuam causando morte celular (VERA-ESTRELLA et al., 1993), e atuam diretamente sobre microrganismos patogênicos (WU et al., 1995). Assim, pode-se explicar a redução da sua atividade nos tecidos avaliados após 288 horas da exposição ao isolamento de *B. cereus*. Silva (2002) também observou que a maior atividade de peroxidase dava-se aos quatro dias após a exposição dos tecidos ao antagonista, conforme o expresso pela bactéria UFV-101. Os tecidos tratados com os outros dois isolamentos de *B. cereus* expressaram maior atividade de peroxidase aos 12 dias, após a aplicação dos antagonistas. Esse fato difere do proposto por Tuzun (2001). Porém, a expressão da enzima pode ocorrer em períodos posteriores, com atraso, quanto à exposição ao eliciador. Aumento nos níveis da enzima em plantas de ervilhaca oriundas de sementes microbiolizadas com um isolamento de *B. subtilis* foi observado, com ótimo aos sete dias após a inoculação do patógeno desafiante *Fusarium udum* (PODILE; LAXMI, 1998). Silva et al. (2008) observaram que duas bactérias endofíticas, um isolamento de *Brevibacillus choshinensis*, denominado 3F, e o isolamento 119 de *Cedecea davisae*, quando dispensado no filoplano de plantas de café, contribuíram para o aumentaram da atividade de peroxidase aos sete dias. De maneira geral, tem se relacionado a síntese de

peroxidase a processos iniciais da exposição da planta ao eliciador, como no caso da UFV-101. Processos esses relacionados a eventos como a morte programada das células que estão diretamente ligadas a “explosão oxidativa” (VERA-ESTRELLA et al., 1993). Porém, é possível a sua expressão em intervalos de tempo maiores como para o caso da UFV-075 e UFV-172.

Peroxidases podem estar relacionadas à formação de barreiras celulares que limitam o progresso e o desenvolvimento do patógeno (TUZUN, 2001) e também a processos de lignificação e reforço da parede celular, na produção de H₂O₂ a partir de NADH ou NADPH, o que pode gerar outras espécies ativas de oxigênio também com capacidade antimicrobiana (PENG; KUC, 1992; LAMB; DIXON, 1997), ou ainda oxidando fenóis e formando compostos mais tóxicos (quinonas) ou mesmo inibindo diretamente o desenvolvimento de patógenos (PENG; KUC, 1992). O envolvimento da peroxidase em respostas de defesa de plantas contra patógenos explica o aumento na atividade dessa enzima nas plantas tratadas com os antagonistas (Figura 4).

O aumento da atividade de quitinase foi observado para os tratamentos UFV-075 e UFV-172, após 48 e 96 horas (Figura 5). Esse resultado não era esperado, pois essa enzima é uma proteína PR ativada pela rota da SAR (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; DIXON et al., 1994), sendo esta rota induzida por patógenos ou indutores químicos (STICHER et al., 1997).

Nos tratamentos aos quais *Xap* foi inoculada, sozinha ou posterior à dispensa dos antagonistas, objetivou-se observar se a planta seria capaz de eliciar seus mecanismos de defesa na presença do patógeno desafiante ou se a expressão da atividade enzimática em plantas expostas aos antagonistas seria alterada na presença do patógeno. Não se observou aumento da atividade enzimática quando plantas foram inoculadas com *Xap* (Figuras 2, 3 e 4). Porém, notou-se que na presença do patógeno, não houve aumento da atividade das enzimas estudadas, exceto para quitinase (Figura 5). Esse resultado está de acordo com o observado por Fujikawa et al. (2006), que verificaram que plantas de fumo transformadas com genes *avr* de *X. axonopodis* pv. *citri* e de *X. oryzae* pv. *oryzae* tinham inibida a sua síntese de fenilalanina-amônio liase, bem como a de fenilpropanóides e também não foram capazes de expressar reação de hipersensibilidade, quando inoculadas com mutantes de *P. fluorescens* que expressavam genes *hrp* de *P. syringae* pv. *syringae*. O que evidenciou que o patógeno pode suprimir a resposta de defesa da planta, mesmo quando exposta previamente ao eliciador. Parece ser essa a explicação para a ausência de resposta às plantas inoculadas com *Xap*,

expostas ou não previamente aos antagonistas. No trabalho de Fujikawa et al. (2006), um dos genes observados foi *avrBs3*. Os genes *avrBs3* podem ser encontrados em alguns patovares de *X. campestris*, hoje possivelmente *X. axonopodis* (DANIELS; LEACH, 1996). Assim, é possível que *Xap* possua esse gene e, dessa forma, AvrBs3 teria impedido a expressão das enzimas indicadoras do estado de indução aqui estudadas.

No ensaio de casa de vegetação, observou-se que os três isolamentos foram capazes de reduzir a severidade de doença (Figura 6). Neste ensaio, optou-se por dispensar os antagonistas na rizosfera de plantas, para que pudesse haver a separação espacial entre o antagonista e o patógeno. Este foi um dos critérios propostos por Steiner; Schönbeck (1995). Silva et al. (2004), trabalhando com o isolamento UFV-101 em tomateiro, demonstraram que o mesmo era capaz de induzir resistência em plantas da cultura. Vieira Júnior (2005), observou que o isolamento UFV-172 restringia a multiplicação de *Xap* no interior de tecidos de folha de feijoeiro quando o antagonista era aplicado externamente e o patógeno infiltrado internamente, havendo assim separação espacial entre eles. Sticher et al. (1997) postulam que quando uma planta tem sua resistência eliciada, ela é capaz de restringir a multiplicação de microrganismos patogênicos em seu interior.

Conclui-se, pelos resultados que os isolamentos UFV-172, UFV-101 e UFV-075 de *B. cereus* induzem resistência em plantas de feijoeiro, independentemente de serem aplicados no rizoplano ou no filoplano.

Referências

- Anderson, A. J.; Blee, K. A.; Yang, K. Y. (2006). Commercialization of plant systemic defense activation: theory, problems and successes. In: Tuzun, S.; Bent, E. (Eds). Multigenic and induced systemic resistance in plants. pp.386-414.
- Athayde Sobrinho, C.; Ferreira, P. T. O.; Cavalcanti, L. S. (2006). Indutores abióticos. In: Cavalcanti, L. S.; Di Piero, R. M.; Cia, P.; Pascholati, S. F.; Resende, M. L V.; Romeiro, R. S. (Eds). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. pp.58-80.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T. M.; Laakso, S. (1981). Lipoxygenase from soybean. *Methods in Enzymology*. 71: 441-451.
- Baracat-Pereira, M. C.; Oliveira, M. G. A.; Barros, E. G.; Moreira, M. A.; Santoro, M. M. (2001). Biochemical properties of soybean leaf lipoxygenases: presence of soluble and membrane-bound forms. *Plant physiology and biochemistry*. 39: 91-98.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61: 289-298.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (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, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2004). Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control*. 30: 342-350.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.

Cavalcanti, L. S.; Brunelli, K. R.; Stangarlin, J. R.. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida (2006). In: Cavalcanti, L. S.; Di Piero, R. M.; Cia, P.; Pascholati, S. F.; Resende, M. L. V.; Romeiro, R. S. (Eds). *Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos*. pp.81-123.

Daniels, M. J.; Leach, J. E. Genetics of *Xanthomona*. (1993). In: Swings, J.G.; Civerolo, E.L. (Eds). *Xanthomonas*. pp.301-331.

Dixon, R. A.; Harrison, M. J.; Lamb, C. J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*. 32:479-501.

Friedrich, L.; Lawton, K.; Ruess, W.; Masner, P.; Specker, N.; Gut Rella, M.; Meier, B.; Dincher, S.; Staub, T.; Uknes, S.; Métraux, J. P.; Kessmann, H.; Ryals, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal*. 10: 61-70.

Fujikawa, T.; Ishihara, H.; Leach, J. E.; Tsuyumu, S. (2006). Suppression of Defense Response in Plants by the *avrBs3/pthA* Gene Family of *Xanthomonas* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 19: 342-349.

Halfeld-Vieira, B. A.; Vieira Júnior, J. R.; Romeiro, R. S.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41: 1247-1252.

Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55: 77-84.

Hammerschmidt, R.; Nuckles, E; Kuc, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiology Plant Pathology*. 20: 73-80.

Heil, M. (2002). Ecological costs of induction resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 1-6.

Heil, M. Trade-offs associated with induced resistance (2007). In: Walters, D.; Newton, A.; Lyon, G. (Eds). *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*. pp.157-178

Kado, C. I.; Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-979.

Kunz, W.; Schurter, R.; Maetzke, T. (1997). The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pesticide Science*. 50: 275-282.

Lamb, C.; Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 48:251-275.

Leeman, M.; Pelt, J.A.V.; Den Ouden, F. M.; Heinsbroek, M.; Bakker, P. A. H. M.; Schippers, B. (1995). Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*. 85: 1021-1027.

Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry*. 47: 273-279.

Liu, L.; Kloepper, J. W.; Tuzun, S. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 85: 843-847.

Macagnan, D.; Romeiro, R. S.; Baracat-Pereira, M. C.; Lanna Filho, R.; Batista, G. S.; Pomella, A. W. V. (2008). Atividade de enzimas associadas ao estado de indução em

mudas de cacauero expostas a dois actinomicetos residentes de filoplano. *Summa Phytopathologica*. 34: 34-37.

Martinez, C.; Montillet, J.L.; Bresson, E.; Agnel, J.P.; Dai, G.H.; Daniel, J.F.; Geiger, J.P.; Nicole, M. (1998). Apoplastic peroxidase generates superoxide anions in cells of cotton cotyledons undergoing the hypersensitive reaction to *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* race 18. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 11: 1038-1047.

Mauch-Mani, B.; Métraux, J. P. (1998). Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. *Annals of Botany*. 82: 535-540.

Mendgen, K.; Lange, M.; Bretschneider, K. (1985). Quantitative estimation of the surface carbohydrates on the infection structures of rust fungi with enzymes and lectins. *Archives of Microbiology*. 140: 307-311.

Métraux, J. P. (2001). Systemic acquired resistance and salicylic acid: Current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 13-18.

Meyer, G.; Capieau, K.; Audenaert, K.; Buchala, A.; Métraux, J. P.; Höfte, M. (1999). Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* Tnsk2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 12: 450-458.

Neil, S.; Desikan, R.; Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Current Opinion in Plant Biology*. 5: 388-395.

Pascholati, S. F.; Nicholson, R. L.; Butler, L. G. (1986). Phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin accumulation in wounded maize mesocotyls. *Journal of Phytopathology*. 115: 165-172.

Peng, M.; Kuc, J. (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*. 82:696-698.

Pieterse, C. M. J.; Pelt, J. A. V.; Ton, J.; Parchmann, S.; Mueller, M. J.; Buchala, A. J.; Métraux, J. P.; Van Loon, L. C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic

resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 57: 123-134.

Pieterse, C. M. J.; Van Wees, S. C. M.; Pelt, J. A. V.; Knoester, M.; Laan, R.; Gerrits, N.; Weisbeek, P. J.; Van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 10: 1571-1580.

Podile, A. R.; Laxmi, V. D. (1998). Seed bacterization with *Bacillus subtilis* AF 1 increases phenylalanine ammonia-lyase and reduces the incidence of fusarial wilt in pigeonpea. *Journal of Phytopathology*. 146: 255-259.

Porta, H.; Rocha-Sosa, M. (2002) Plant lipoxygenases. *Physiological and molecular features*. *Plant Physiology*. 130: 15-21.

Romeiro, R. S. (2005). *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S.; Filho, R. L.; Vieira Junior, J. R.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C.; Carvalho, M.G. (2005). Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*. 153:120-123.

Romeiro, R. S.; Kimura, O. (1997). Induced resistance in pepper leaves infiltrated with purified elicitors from *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Journal of Phytopathology*. 145: 495-498.

Santos, J. B. e Gavilanes, M. L. Botânica. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T.J.; Borém, A. (Eds). *Feijão*. 2^{ed}. 2006. pp.41-66.

Silva, H. S. A. Rizobactérias como promotoras do crescimento de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares da cultura. 2002. 115 f. (Tese D.S.). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S.; Macagnan, D.; Halfeld-Vieira, B. A.; Baracat-Pereira, M.C.; 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, H. S. A.; Terrasan, C. R. F.; Tozzi, J. P. L., Melo, I.; Bettiol, W. (2008). Bactérias endofíticas do cafeeiro e a indução de enzimas relacionadas com o controle da ferrugem (*Hemileia vastatrix*). *Tropical Plant Pathology*. 33: 49-54.

Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 35:235-270.

Steiner, U.; Schönbeck, F. Induced disease resistance in monocots. (1995). In: Hammerschmidt, R.; Kuc, J. (Eds.). *Induced resistance to disease in plants (Developments in plant pathology, V4)*. pp.86-110.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2004). *Fisiologia vegetal*. Porto Alegre. Artmed Editora.

Thompson, S. E.; Smith, M.; Wilkinson, M. C.; Peek, K. (2001). Identification and characterization of a chitinase antigen from *Pseudomonas aeruginosa* strain 385. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 4001-4008.

Tuzun, S. (2001). The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology*. 107:85-93.

Vale, F. X. R.; Fernandes Filho, E. R.; Liberato, J. R. (2004). QUANT - a Software for plant disease severity assessment. In: Roy E. Gaunt Memorial Workshop on Disease and Crop Loss Assessment. Christchurch.

Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453-483.

Van Loon, L. C.; Van Strien, E. A (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analyses of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 55:85-97.

Vera-Estrella, R.; Blumwald, E.; Higgins, V. J. (1993). Non-specific glycopeptide elicitors of *Cladosporium fulvum*: evidence for involvement of active oxygen species in elicitor-induced effects on tomato cell suspensions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 42: 9-22.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Xue, L.; Charest, P. M.; Jabaji-Hare, S. H. (1998). Systemic induction of peroxidases, 1,3- β -glucanases, chitinases, and resistance in bean plants by binucleate *Rhizoctonia* species. *Phytopathology*. 88: 359-365.

Walters, D.; Walsh, D.; Newton, A.; Lyon, G (2005). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. *Phytopathology*. 95: 1368-1373.

Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*. 322: 681-692.

Wu, G.; Shortt, B.; Lawrence, E.; Levine, E.; Fitzsimmons, K.; Shah, D. (1995). Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *The Plant Cell*. 9: 1357-1368.

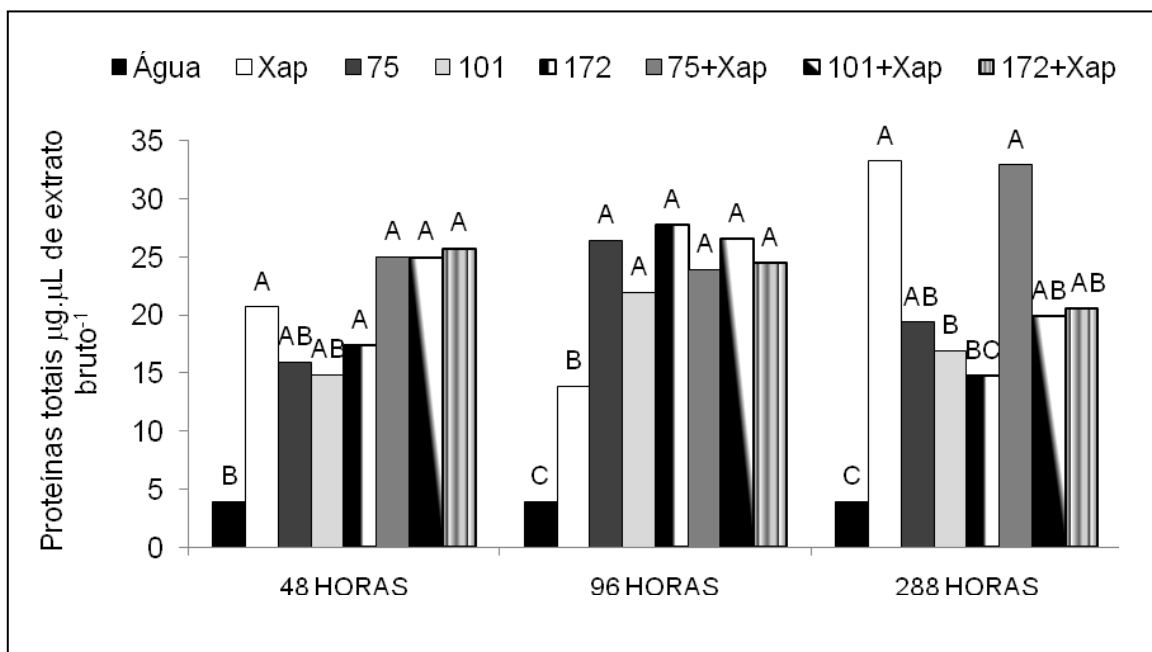


Figura 1 – Concentração de proteínas totais determinadas em extrato foliar bruto de plantas expostas aos antagonistas UFV-172, UFV-101 e UFV-075, plantas expostas aos antagonistas e posteriormente inoculadas com *Xap*, e plantas inculcadas com o patógeno desafiante. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%.

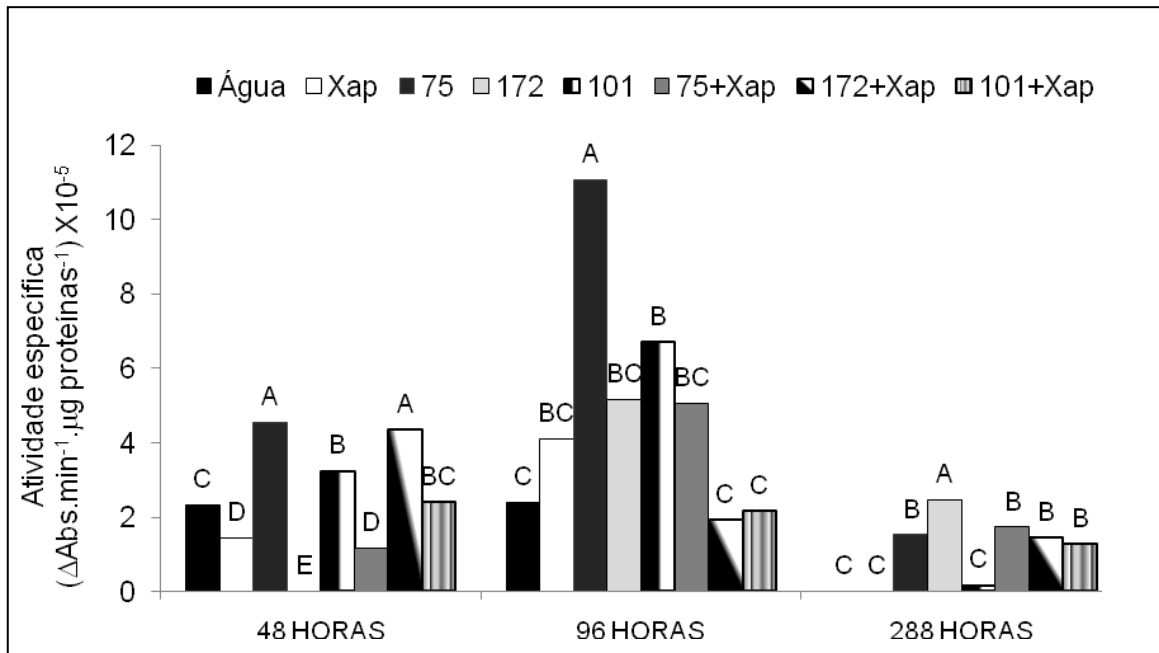


Figura 2 – Atividade de β -1,3-glucanase determinada em extrato foliar de plantas expostas aos antagonistas UFV-172, UFV-101 e UFV-075, plantas expostas aos antagonistas e posteriormente inoculadas com *Xap*, e plantas inculcadas com o patógeno desafiante. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%.

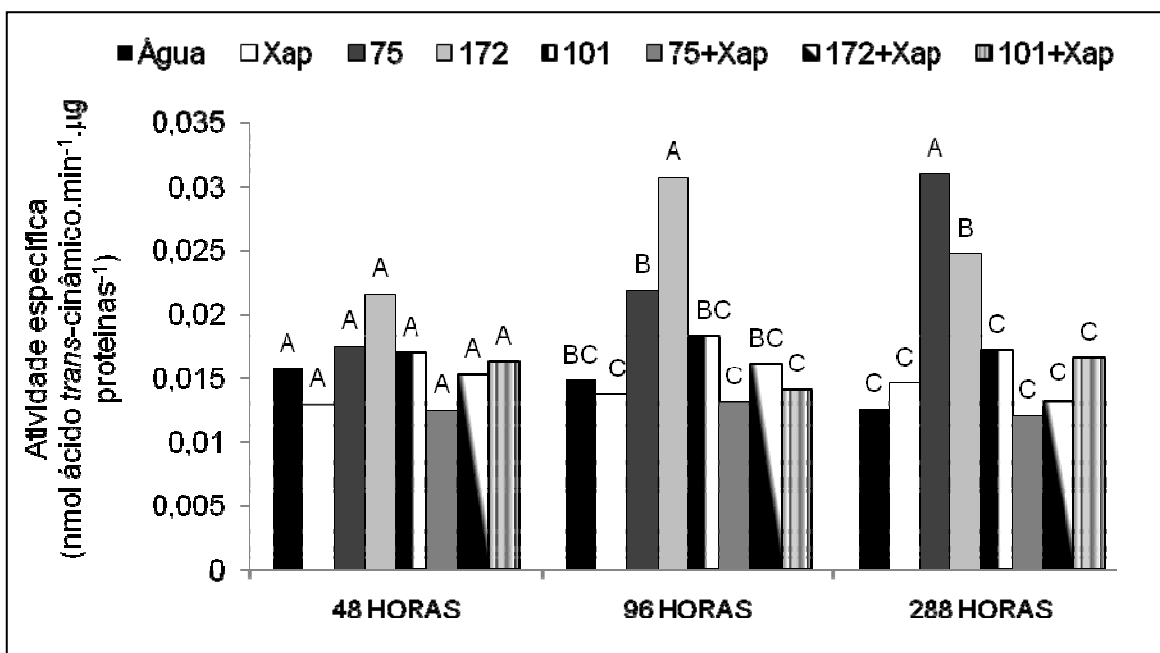


Figura 3 – Atividade de fenilalanina-amônio liase determinada em extrato foliar de plantas expostas aos antagonistas UFV-172, UFV-101 e UFV-075, plantas expostas aos antagonistas e, posteriormente inoculadas com *Xap*, e plantas inculcadas com o patógeno desafiante. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%.

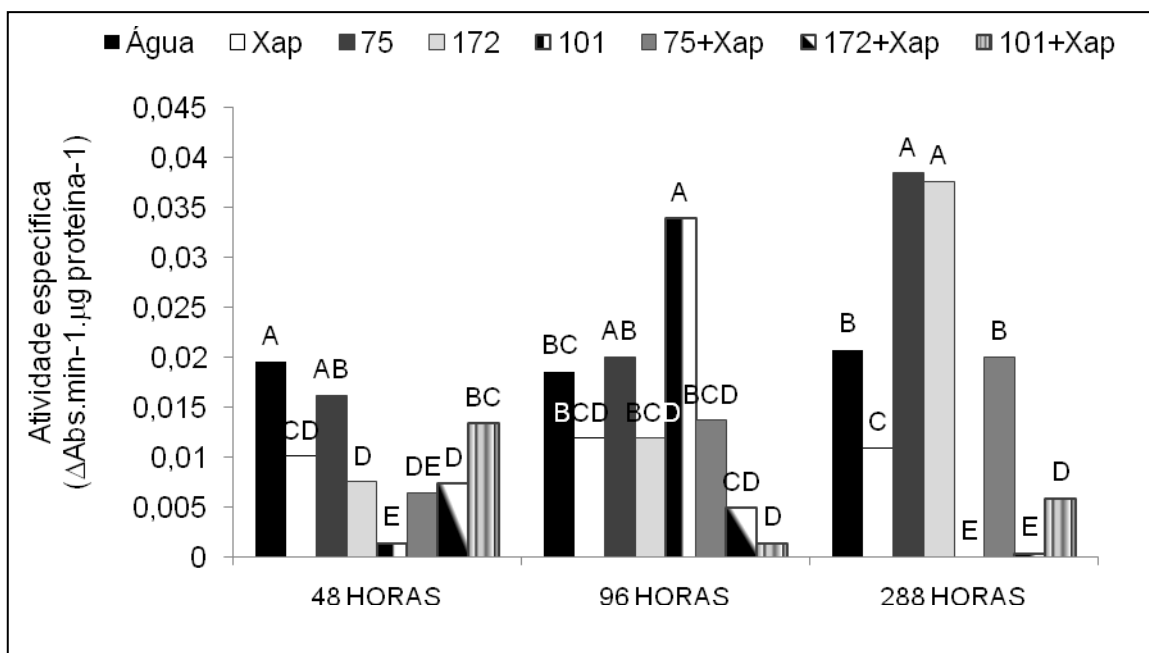


Figura 4 - Atividade de peroxidase determinada em extrato foliar de plantas expostas aos antagonistas UFV-172, UFV-101 e UFV-075, plantas expostas aos antagonistas e, posteriormente, inoculadas com *Xap*, e plantas inculcadas com o patógeno desafiante. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%.

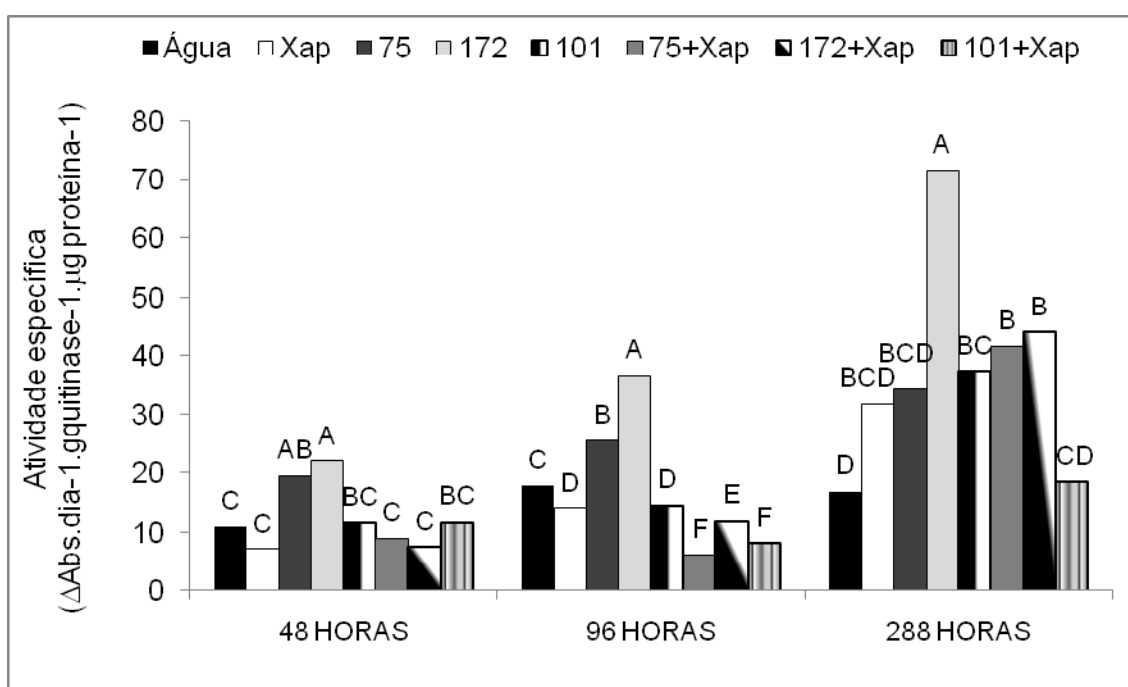


Figura 5 - Atividade de quitinases determinada em extrato foliar de plantas expostas aos antagonistas UFV-172, UFV-101 e UFV-075, plantas expostas aos antagonistas e, posteriormente, inoculadas com *Xap*, e plantas inculcadas com o patógeno desafiante. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%.

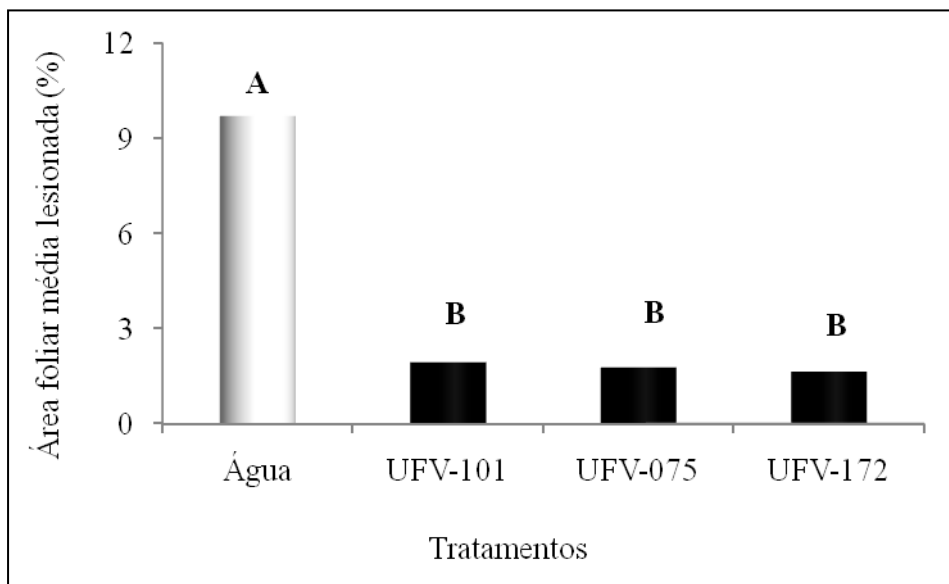


Figura 6 - Severidade de crestamento bacteriano comum do feijoeiro, em plantas que tiveram o sistema radicular exposto aos isolamentos de *Bacillus cereus*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5%.

CAPÍTULO 3

Promoção de Crescimento em Feijoeiro pela Dispensa de Procariotas no Filoplano de Plantas da Cultura

Resumo

O efeito de promoção de crescimento em plantas por microrganismos é relacionado geralmente a fungos e, principalmente, a bactérias habitantes da rizosfera de plantas. Ainda é pouco usual e aceito o uso de microrganismos residentes de filoplano como promotores de crescimento. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar a capacidade de cinco agentes de biocontrole previamente selecionados, para promover o crescimento de plantas de feijão, quando dispensados no filoplano de plantas da cultura. Para isso foram montados dois ensaios em condições de casa de vegetação com plantas do cultivar Pérola, e um ensaio de campo, com plantas dos cultivares Pérola e Ouro Negro. As plantas foram atomizadas semanalmente com propágulos de cinco procariotas, ou seja três isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101 e UFV-075) e dois de *Pseudomonas putida* (UFV-053 e UFV-Pp), no ensaio a campo. Acibenzolar-s-metil (ASM) e o fungicida clorotalonil também foram utilizados. Nos ensaios de casa de vegetação, avaliou-se o possível aumento na altura de plantas, no número de folíolos, peso de matéria fresca e seca, no número de vagens e incremento no número e peso de sementes. No primeiro ensaio, observou-se aumento do número e

peso de sementes à UFV-172 e UFV-075. No segundo, além das características mencionadas no primeiro ensaio, notou-se o aumento de matéria fresca e seca. No ensaio de campo, avaliou-se a produção pelo peso médio de sementes, já nos dois ensaios de casa de vegetação, os isolamentos UFV-075 e UFV-172 foram capazes de aumentar a produção. O isolamento UFV-Pp aumentou a produção apenas no segundo ensaio de casa de vegetação e no ensaio de campo, todos os tratamentos aumentaram a produção quanto ao tratamento controle.

Growth-promotion in dry bean after delivering prokaryotes to the phylloplane

Abstract

The idea of plant growth-promotion due to microorganisms is mainly associated to fungi as well as to rhizobacteria. Up to now it is poorly studied and accepted the use of phylloplane residents as growth-promoters. The objective of this paper was to evaluate the ability of five previously selected biocontrol agents for promoting bean growth if delivered to the phylloplane and two experiments were set under greenhouse conditions with the Perola cultivar and a field trial by using both Perola and Ouro Negro cultivars. Weekly, plants were sprayed with live propagules of *Bacillus cereus* (isolates UFV-172, UFV-101 and UFV-075) and *Pseudomonas putida* (isolates UFV-053 and UFV-Pp). In the field trial, acylbenzolar-S-methyl (ASM) and the fungicide chlorothalonil were also included. In greenhouse experiments were evaluated increases in plant height, number of leaflets, plant fresh and dry weight, number of pods as well as number and weight of seeds. In the first greenhouse assay it was observed increases in number and weight of seeds while in the second one we noticed increases not only in seed number and weight but also in plant fresh and dry weight. In the field experiment, production was evaluated by seed weight. In greenhouse assays, isolates UFV-075 and UFV-172 increased seed yield, isolate UFV-Pp increased yield only in the second assay while in the field trial all treatments brought about yield increases when compared to the controls.

Introdução

A produção vegetal é fortemente influenciada por fatores edafoclimáticos e, assim, inúmeros processos são aplicados pelo homem a fim de alterar, de forma benéfica, as condições de produção, sobretudo as que se referem ao solo. Tradicionalmente o que se tem usado são os métodos químicos e físicos no manejo do solo para o aumento da produção vegetal, não empregando microrganismos.

Algumas bactérias são capazes de colonizar a rizosfera de plantas atuando positivamente para o seu crescimento. Estas foram denominadas por Kloepper e Schroth (1978) PGPR (plant growth-promoting rhizobacteria), sigla está que significa rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. Tornando-se assim uma possibilidade para a potencialização da produção vegetal. Além de promoverem o crescimento de plantas, PGPR podem aumentar o número e tamanho de frutos, bem como o número de sementes e a porcentagem de enraizamento de plantas (TEIXEIRA et al., 2001; MAFIA et al., 2002; SILVA, 2002; SILVA et al., 2004ab).

Vários mecanismos estão envolvidos na promoção de crescimento, quando as PGPRs estão relacionadas ao processo. Esses mecanismos podem ser divididos em diretos e indiretos. PGPR podem atuar como antagonistas e promovendo o crescimento por meio do controle de fitopatógenos (TUZUN; KLOEPPER, 1995; CHEN et al., 1996; SILVA; ROMEIRO, 2004; SILVA et al., 2004b; RAN et al., 2005). Esse seria o mecanismo indireto de promoção de crescimento, uma vez que ao ocorrer a restrição do progresso da doença, a planta pode desenvolver-se com maior eficiência.

Nos mecanismos diretos de promoção de crescimento por PGPR, ocorre a síntese de compostos por parte das bactérias, que são capazes de estimular o crescimento da planta ou facilitar, de alguma forma, a captura de requisitos nutricionais essenciais à planta. Esses compostos produzidos pela PGPR podem atuar na solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio, produção de sideróforos como forma de tornar lábil o ferro para a planta, na produção ou indução de síntese de fitormônios e redução dos níveis de etileno, dentre outros (BUCHENAUER, 1998; CATTELAN et al., 1999; GUTIERREZ-MANERO et al., 2001).

No que se refere ao uso de procariotas residentes de filoplano como promotores de crescimento de plantas, pouco se sabe sobre as possíveis interações que estas podem estabelecer ou implementar com a superfície foliar (Hirano e Upper, 2000; Kinkel, 1997). Vieira Júnior (2005), trabalhando com um universo de 500 isolamentos bacterianos do filoplano de feijoeiro, conseguiu selecionar um isolamento de *Pseudomonas putida* (UFV-074), capaz de atuar como promotor de crescimento, tendo efeito no aumento de produção de vagens e sementes. Os resultados obtidos pelo autor demonstram que residentes de filoplano possuem potencial como promissores agentes tanto de controle biológico como promotores de crescimento vegetal, sendo necessários maiores estudos sobre esses organismos, ampliando o conhecimento sobre eles e as possibilidades de sua utilização em benefício do homem.

Objetivou-se presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de cinco procariotas, previamente selecionados como agentes de biocontrole para promover o crescimento de plantas de feijoeiro em condições de casa de vegetação e de campo, quando dispensados no filoplano de plantas da cultura.

Material e Métodos

Microrganismos, sua origem e cultivo

Os microrganismos utilizados pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV e foram previamente selecionados como agentes de biocontrole. São estes os procariotas usados: três isolamentos de *Bacillus cereus* UFV-172 e UFV075 isolados de filoplano de feijoeiro (VIEIRA JÚNIOR, 2005); UFV-101 isolado de rizosfera de tomateiro (SILVA et al.,

2003); dois isolamentos de *Pseudomonas putida* UFV-Pp isolado de filoplano de tomateiro (HALFELD-VIEIRA, 2002) e UFV-053 isolado de rizosfera de feijoeiro (MENDONÇA, 2006). As bactérias foram cultivadas no meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e, posteriormente, preservadas por repicagem tubo-a-tubo e sob óleo mineral (ROMEIRO, 2007b).

Preparo dos microrganismos

Os cinco procariotas cultivados em meio 523 sólido (KADO; HESKETT, 1970), por 20 horas a 28 °C, foram coletados com o auxílio de alça de Drygalski e suspensos em água com concentração ajustada para densidade óptica de 0,4 a 540 nm.

Promoção de crescimento em casa de vegetação

Para avaliar a promoção de crescimento em casa de vegetação, em vasos de quatro litros contendo terriço não esterilizado procedeu-se à semeadura de uma semente de feijoeiro cultivar Pérola, por vaso. Estes foram alocados em casa de vegetação com controle parcial de temperatura. Dez dias após a emergência, as plantas foram pulverizadas semanalmente com uma suspensão dos procariotas, até a colheita. O meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), denominado MB1 neste trabalho, também foi atomizado em plantas para averiguar se o possível efeito de promoção foi devido aos componentes do meio de cultura ou pela ação dos procariotas. O controle consistiu de plantas que tiveram seu filoplano atomizado com água.

Plantas no estágio R9 tiveram a sua altura, número de folíolos, vagens e sementes, peso de matéria fresca e seca de parte e peso de sementes avaliados. Para a avaliação do peso de matéria fresca, a parte aérea de plantas (folhas e caule) foi coletada e pesada. Para a determinação do peso de matéria seca, as plantas utilizadas para a quantificação do peso de matéria fresca foram colocadas em envelopes de papel, pesadas e levadas à estufa de secagem com circulação de ar, regulada para temperatura de 70 °C \pm 2 e ali mantidas até a constância de peso. Para a quantificação do peso de sementes, após a contagem do número de sementes, estas foram colocadas em envelopes de papel e secadas em estufa da mesma forma que para a determinação do peso de matéria seca. O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com 18 repetições por tratamento e duas repetições no tempo, uma de março a junho de 2006 e outra de outubro de 2006 a janeiro de 2007.

Promoção de crescimento em condições de campo

O experimento foi montado em uma área experimental do Departamento de Fitopatologia da UFV, em Viçosa, MG. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, seis blocos compostos por oito tratamentos, UFV-172, UFV-101, UFV-075, UFV-053, UFV-Pp, acibenzolar-s-metil (ASM) e o fungicida clorotalonil. Os cultivares Pérola e Ouro Negro foram usados para a condução do ensaio. Procedeu-se à semeadura em sulcos na densidade de plantio de 14 sementes por metro, e o espaçamento entre sulcos foi de 60 cm, tendo cada sulco 2,5 metros de comprimento. A adubação foi realizada antes do plantio, seguindo-se a análise química do solo. Plantas no estágio V3 de desenvolvimento (Fernández et al., 1985), citados por Santos e Gavilanes (2006) foram atomizados com suspensão de propágulos das cinco bactérias, com concentração ajustadas ($OD_{540nm} = 0,4$), suspensão de ASM, com concentração ajustada para $150 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e clorotalonil 2g.L^{-1} . Os tratamentos foram aplicados semanalmente até o fim do ensaio, que se deu no estágio R9. O experimento foi conduzido de fevereiro a junho de 2007. A avaliação foi realizada quantificando-se a produção pelo peso médio de sementes por planta.

Resultados

Nos dois ensaios realizados em casa de vegetação não houve efeito dos procariotas sobre a altura de plantas (dados não apresentados). No ensaio conduzido de março a junho de 2006, não foi observado aumento no número de folíolos (dados não apresentados). Entretanto, plantas tratadas com o meio MB1 apresentaram um menor número de vagens que plantas expostas aos outros tratamentos (Figura 1). Em relação ao peso de matéria fresca, os isolamentos UFV-172, UFV-101, UFV-075 e UFV-053 foram capazes de promover o seu incremento no ensaio 2 (Figura 4A), mas não no ensaio 1 (dados não apresentados). No ensaio 2 também observou aumento do peso de matéria seca em plantas tratadas com os isolamentos UFV-172, UFV-101 e UFV-075.

Os isolamentos UFV-172 e UFV-75 aumentaram a produção quanto ao número de sementes por planta (Figura 2A) e ao peso médio de semente por planta (Figura 2B). As plantas tratadas com o meio MB1 foram as que apresentaram a menor produção.

No ensaio realizado de outubro de 2006 à janeiro de 2007, houve aumento no número médio de folíolos por planta, quando expostas aos isolamentos UFV-172, UFV-101 e UFV-075 (Figura 3), o que refletiu no peso de matéria fresca e seca (Figuras 4 A e B). A produção de sementes foi aumentada em plantas que tiveram seu filoplano atomizado com propágulos de UFV-172, em relação ao número e peso de sementes (Figuras 5 A e B). Embora não tenha aumentado o número de sementes, os isolamentos UFV-101, UFV-075 e UFV-Pp aumentaram o peso médio de sementes (Figuras 5 A e B).

No ensaio de campo, notou-se aumento da produção em plantas tratadas com os antagonistas, em relação ao controle para os cultivares Pérola e Ouro Negro (Figura 6 A e B).

Discussão

A interação dos isolamentos bacterianos com o feijoeiro não foi capaz de estimular o incremento de altura das plantas. Outro fator a ser considerado seria a menor taxa de luz que ocorre dentro da casa de vegetação, embora Andrade et al. (2006) afirmem que feijoeiro não é fortemente influenciado por esse fator. Também não se pode descartar a hipótese de que o aumento da altura seja limitada por características genéticas do cultivar utilizado, e que assim a planta não tenha respondido aos estímulos dos promotores e, dessa forma, não houvesse diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Vieira Júnior (2005), ao testar 16 isolamentos bacterianos residentes de filoplano como promotores de crescimento de plantas de feijão em condições de casa de vegetação, observou que a grande parte desses foram capazes de aumentar o número e peso de sementes, o número de vagens e a área foliar. Porém, a maioria dos isolamentos (15) não foi capaz de incrementar a altura de plantas. Esse relato corrobora com a última hipótese apresentada, embora não seja possível afirmar qual das três seria a real causa da ausência do incremento da altura de plantas.

O aumento de produção observado nos dois ensaios de casa de vegetação e no de campo foi importante. A elevação do peso e do número de sementes são características altamente desejáveis, pois o aumento de produção é o principal objetivo da agronomia. Os resultados apresentados nesse trabalho levam a uma nova possibilidade para o uso de microrganismos na promoção de crescimento de plantas. É amplamente conhecido o efeito de bactérias e até de fungos da rizosfera como promotores de crescimento de

plantas (SHIVANNA et al., 2005; ROMEIRO, 2007a). Porém, a capacidade de os residentes de filoplano promoverem o crescimento de plantas é assunto ainda controverso. Na maioria dos trabalhos, tem-se observado apenas a sua capacidade de atuar como agente de controle biológico de doenças (WINDELS; LINDOW, 1985; BETTIOL, 1991; HALFELD-VIEIRA et al., 2006; ROMEIRO, 2007a). Entretanto, há relatos de residentes de filoplano interferindo positivamente no desenvolvimento de plantas, atuando como estimuladores do crescimento vegetal, de forma semelhante a rizobactérias (GLICK; BASHAN, 1997; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2001; VIEIRA JÚNIOR, 2005). Holland (1997) sugere que a produção de fitormônios por bactérias estimularia o rápido desenvolvimento da planta e que compostos liberados nas folhas seriam utilizados como fonte nutricional pelas bactérias. A síntese de fitormônios e seu efeito no crescimento de plantas de fumo foram observados em plantas expostas a bactérias residentes de filoplano (HOLLAND; POLACCO, 1992). Em outra linha, bactérias poderiam atuar na degradação de alguns metabólitos complexos liberados pela planta no seu filoplano, em produtos mais simples, que eventualmente seriam re-absorvidos e utilizados em seu metabolismo (STEBBINS et al., 1992).

Referências

Andrade, M. J. B.; Carvalho, A. J.; Vieira, N. M. B. (2006) Exigências edafoclimáticas. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T.J.; Borém, A. (Eds). Feijão. 2^{ed}. pp.67-86.

Bettiol, W. Controle biológico de doenças do filoplanço (1991). In: Bettiol, W. (Ed.). Controle biológico de doenças de plantas. pp. 33-52.

Buchenauer, H. (1998). Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*. 105: 329-348.

Bloemberg, G. V.; Lugtenberg, J. J. (2001). Molecular basis of growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Pathology*. 1: 343-350.

Cattelan, A. J.; Hartel, P. G.; Fuhrmann, J. J. (1999). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*. 63: 1670-1680.

Chen, Y.; Mei, R.; Liu, L.; Kloepper, J. W. (1996). The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: Utkhede, R.S.; Gupta, V.K (Eds). *Management of Soil Born Diseases*. pp.165-184.

Glick, B. R.; Bashan, Y. (1997). Genetic manipulation of plant growth promoting bacteria to enhance biocontrol of phytopathogens. *Biotechnology Advances*. 15: 353-378.

Gutierrez-Manero, F. J.; Ramos, B. M.; Probanza, A.; Mehouchi, J.; Tadeo, F. R.; Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*. 111: 206-211.

Halfeld-Vieira, B. A. H. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. 108 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Halfeld-Vieira, B. A.; Vieira Júnior, J. R.; Romeiro, R. S.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41: 1247-1252.

Hirano, S. S.; Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 624-653.

Holland M. A. (1997). Occam's razor applied to hormonology. Are cytokinins produced by plants? *Plant Physiology*. 115: 865-868.

Holland M. A.; Polacco, J. C. (1992). Effect of bacterial hormones in plants: considerations. *Plant Physiology*. 98: 942-948.

Kado, C. I.; Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-979.

Kinkel, L. L. (1997). Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 327-347.

Kloepper, J. W.; Schroth, M. M. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. In: international conference on plant pathogenic bacteria, 4, 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: 8. pp.879-882.

Mafia, R. G., Alfenas, A. C.; Romeiro, R. S. (2002). Colonização de raízes de *Eucalyptus* sp. por rizobactérias. *Fitopatologia Brasileira*. 27: 63.

Mendonça, H. L. Seleção de rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de resistência em feijoeiro. 2006. 67 f Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Ran, L. X.; Van Loon, L. C.; Bakker, H. M. (2005). No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in arabidopsis. *Phytopatology*. 95: 1349-1355.

Romeiro, R. S.(2007a). Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S. (2007b). Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. Viçosa, Editora UFV.

Santos, J. B.; Gavilanes, M. L. (2006). Botânica. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds). Feijão. 2^{ed}. pp.41-66.

Shivanna, M. B.; Meera, S. M.; Kubota, M.; Hyakumachi, M. (2005). Promotion of growth and yield in cucumber by zoysiagrass rhizosphere fungi. *Microbes and Environments*. 20: 34-40.

Silva, H. S. A. Rizobactérias como promotoras do crescimento de plantas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e indutoras de resistência sistêmica a patógenos foliares da cultura. 2002. 115 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Silva, H. S. A.; Deuner, C. C.; Romeiro, R. S. (2004b). Crescimento de tomateiro avaliado após aplicação de rizobactérias selecionadas para indução de resistência sistêmica a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Summa Phytopathologica*. 30: 281-283.

Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S. (2004). Isolamento e seleção massal de rizobactérias indutoras de resistência sistêmica à mancha-bacteriana-pequena do tomateiro. *Revista Ceres*. 51: 345-354.

Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S.; Macagnan, D.; Halfeld-Vieira B. A.; Pereira, M. C. B.; Mounteer, A. (2004a). Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. *Biological Control*. 29: 288-295.

Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S.; Mounteer, A. (2003). Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. *Journal of Phytopathology*. 151: 42-46.

Steenhoudt, O.; Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 487-506.

Stebbins, N. E.; Holland, M. A.; Polacco, J. C. (1992). *Methylobacterium* spp. in soybean rhizosphere. *Plant Physiology*. 99: 33-36.

Teixeira, D. A., Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Maffia, L. A.; Romeiro, R. S. (2001). Promoção de crescimento e indução de resistência à ferrugem (*Puccinia pisidii*) em Eucalyptus por rizobactérias. *Fitopatologia Brasileira*. 26: 304 - 305.

Tuzun, S.; Kloepper, J. W. (1995). Potential applications of plant growth-promoting rhizobacteria to induced systemic disease resistance. In: Reuveni, R (Ed.) *Novel approaches to integrated pest management*. pp.115-127.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Windels, C. E.; Lindow, S. E. (1985). *Biological control on the phylloplane*. St. Paul, APS Press.

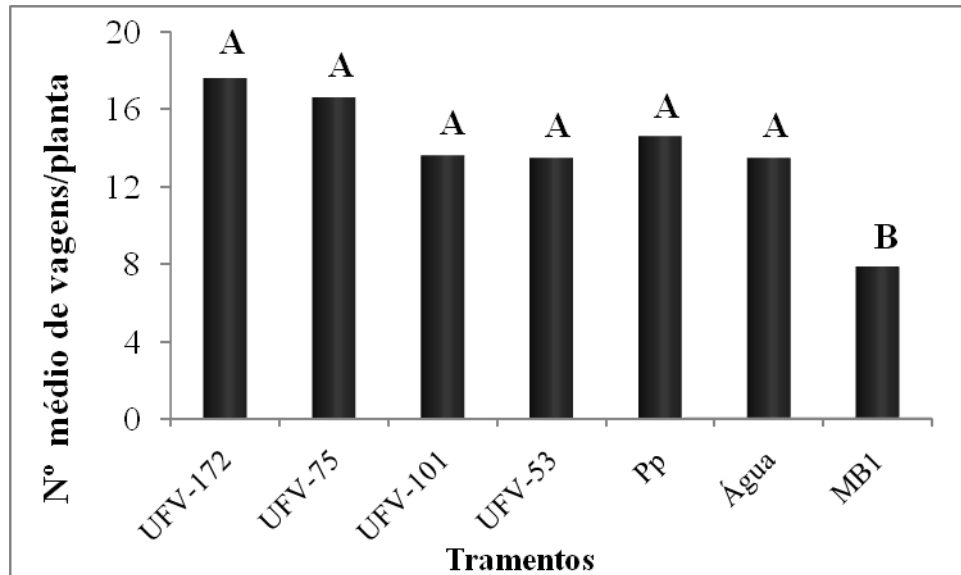


Figura 1 – Efeito de *B. cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *P. putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre o número de vagens em feijoeiro cultivar Pérola, em condições de casa de vegetação, no período de março a junho de 2006. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. MB1 = Meio 523 (KADO; HESKETT, 1970)

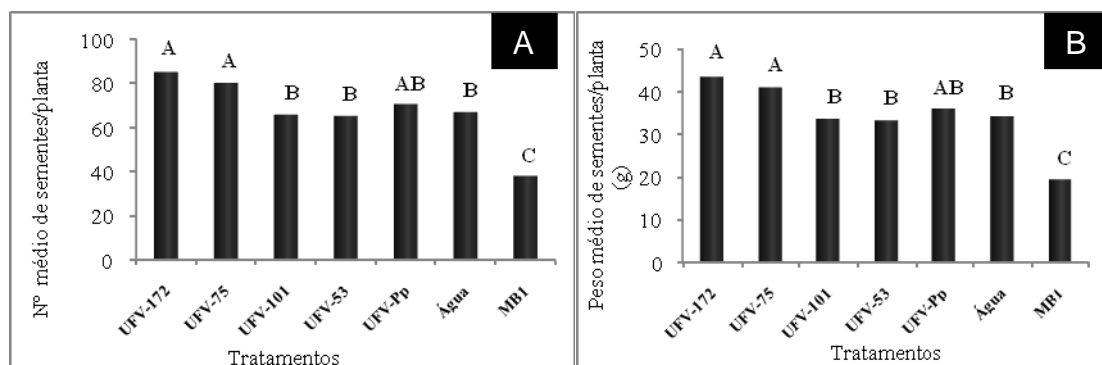


Figura 2 – Efeito de *B. cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *P. putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre a produção de feijão cultivar Pérola, em casa de

vegetação, no período de março a junho de 2006. A) Número médio de sementes por planta. B) Peso médio de sementes por planta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. MB1 = Meio 523 (KADO; HESKETT, 1970).

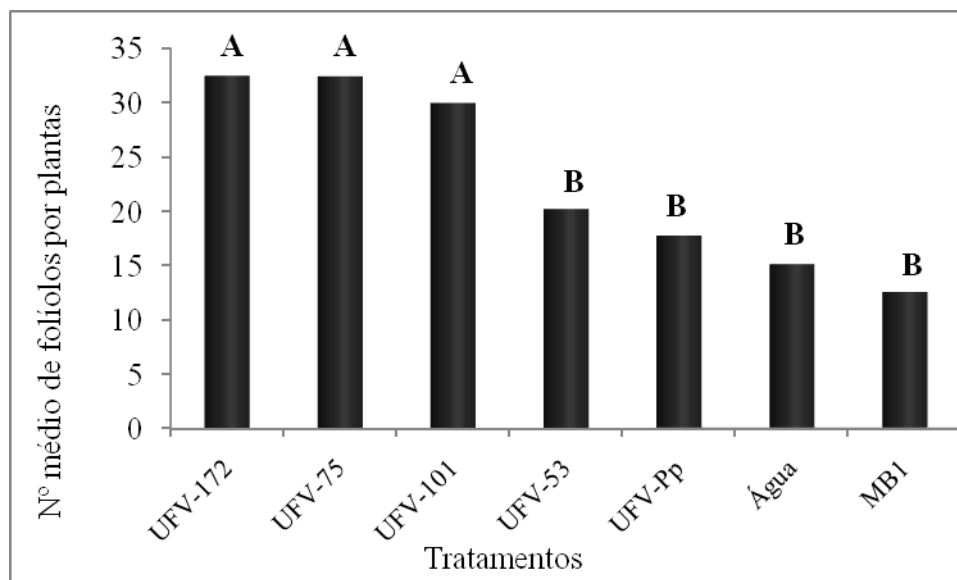


Figura 3 – Efeito de *B. cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *P. putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre o número médio de folíolos em feijoeiro cultivar Pérola, em condições de casa de vegetação, no período de outubro de 2006 a janeiro de 2007. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. MB1 = Meio 523 (KADO; HESKETT, 1970).

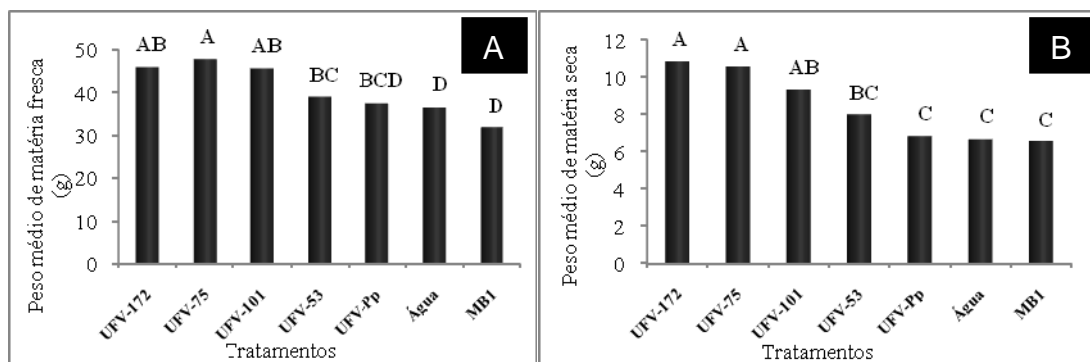


Figura 4 – Efeito de *B. cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *P. putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre incremento de massa de filoplano de plantas de feijão cultivar Pérola, em condições de casa de vegetação, no período de outubro de 2006 a janeiro de 2007. A) Peso médio de matéria fresca. B) Peso médio de matéria seca. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. MB1 = Meio 523 (KADO; HESKETT, 1970).

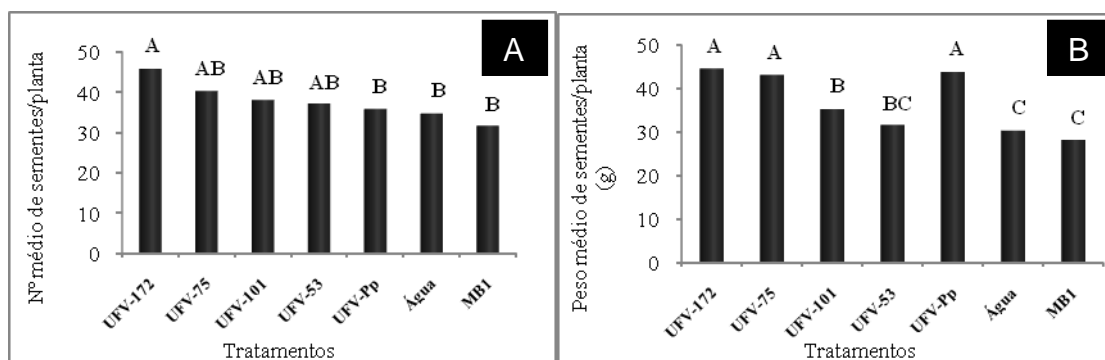


Figura 5 – Efeito de *B. cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *P. putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre a produção de feijão cultivar Pérola, em condições de casa de vegetação, no período de outubro de 2006 a janeiro de 2007. A) Número médio de sementes por planta. B) Peso médio de sementes por planta. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. MB1 = Meio 523 (KADO; HESKETT, 1970).

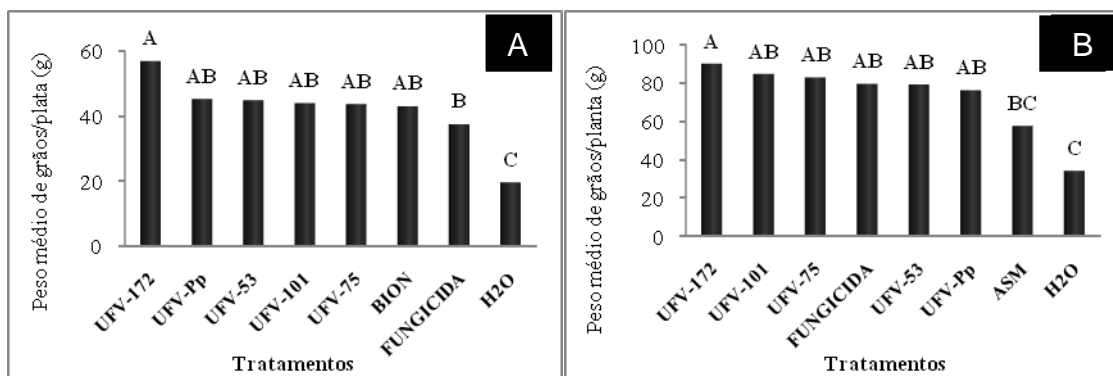


Figura 6 – Efeito de *B. cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *P. putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre a produção de feijão, em condições de campo, expressa pelo peso médio de grãos por planta. A) Cultivar Pérola. B) Cultivar Ouro-Negro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey, a 5% de probabilidade. ASM = acibenzolar-s-metil. FUNGICIDA = Clorotalonil.

CAPÍTULO 4

Biocontrole da Mancha Angular do Feijoeiro, pela Dispensa de Antagonistas no Filoplano

Resumo

A mancha angular do feijoeiro é uma das principais doenças da cultura, levando a perdas severas na produção de feijão no Brasil. É de difícil controle, tanto químico quanto pelo uso de resistência genética. Assim, há necessidade de se buscarem medidas que visem aumentar a eficiência do controle. O biocontrole é uma dessas medidas que estão sendo estudadas com promissores resultados. Dentre os vários agentes de controle biológico, procariotas residentes de filoplano têm demonstrado grandes possibilidades. Assim, objetivou-se neste trabalho avaliar a eficiência de cinco agentes de biocontrole, no controle da mancha angular do feijoeiro em condições de campo. Para tanto, dois ensaios foram montados em duas épocas diferentes, usando dois cultivares de feijoeiro: Pérola e Ouro Negro. Os ensaios foram montados no delineamento em blocos casualizados, com seis blocos. Os tratamentos foram plantas atomizadas com três isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, Ufv-101, Ufv-075) e dois isolamentos de *Pseudomonas putida* (UFV-053 e Ufv-Pp), acibenzolar-S-metil, fungicida clorotalonil e água. Os tratamentos foram aplicados por atomização no filoplano de plantas de feijoeiro, semanalmente, a partir dos 15 dias após a emergência até o fim do ensaio. Avaliou-se o progresso da mancha angular do feijoeiro (*Pseudocercospora griseola*), que ocorreu naturalmente. Os antagonistas foram eficientes em controlar o progresso da mancha angular, nas condições testadas neste ensaio, em relação ao controle.

Biocontrol of the angular leaf spot in beans by delivering prokaryotic antagonists to the phylloplane

Abstract

The angular leaf spot is one of the most important diseases in beans, bringing about severe losses in Brazil. Disease control is a difficult task by using either chemicals or genetic resistance strategies. Consequently, to search for measures in order to improve control efficiency is a need and biological control is one of the measures that have presenting promising results. On the other hand, prokaryotic phylloplane residents have been showing good possibilities. This paper had as main purpose to evaluate the efficiency of five biocontrol agents for the bean angular leaf spot under field conditions. Two trials were set, in distinct occasions, with two bean cultivars namely 'Pérola' e 'Ouro Negro'. The statistical model was randomized blocks, with six replicates. Treatments (08) consisted in sprays with live propagules of three *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) isolates, two *Pseudomonas putida* (UFV-053 e UFV-Pp) isolates, acylbenzolar-S-methyl, the fungicide chlorothalonil and water. Treatments were applied to the phylloplane, weekly, from 15 days after germination. The progress of the angular leaf spot (*Pseudocercospora griseola*), naturally occurring, was evaluated. The antagonists were efficient in controlling the angular leaf spot, under the conditions of the experiments.

Introdução

A mancha angular, causada por *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) Crous e Braun, é uma das principais doenças que ocorrem na cultura do feijão. Até o fim da década de 1980 era considerada de pouca importância, em razão de ocorrer com mais frequência no fim do ciclo da cultura (VIEIRA, 1988). Porém, devido a vários fatores esse *status* alterou-se e, é hoje uma das doenças mais importantes da cultura (SARTORATO; RAVA, 1994), se não a mais importante para algumas regiões do Brasil. No Estado de Minas Gerais, é a principal doença de parte aérea do feijoeiro (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006). As perdas causadas pela ocorrência da mancha angular são importantes fatores na baixa produtividade da cultura no Brasil, que ainda assim configura-se como um dos principais produtores mundiais (YOKOYAMA, 2002).

A severidade da doença pode ser agravada quando condições favoráveis ao patógeno são encontradas. Em Minas Gerais, geralmente ocorre de abril a julho (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006), quando se configura o chamado plantio “da seca”. Esse fato é importante, pois a maioria dos cultivos desse período caracteriza-se pela baixa tecnologia aplicada (PAULA JÚNIOR et al., 2007). As perdas na produção podem ser muito severas sob condições favoráveis (SARTORATO; RAVA, 1992; RODRIGUES et al., 1999), podendo chegar à 70% (SARTORATO, 2007).

A doença é de difícil controle e o uso de cultivares resistentes é fato controverso, pois muitas vezes, cultivares relatados como resistentes por alguns autores são relatados como suscetíveis por outros (FALEIRO et al., 2001; 2004; RAGAGNIN, 2003; MELO et al. 2008). O mesmo ocorre com o controle químico em que a eficiência do produto utilizado é variável de acordo com o autor (SARTORATO; RAVA, 2003; REIS-PRADO, 2006; Sartorato, 2006).

Logo, é necessária a busca de medidas de manejo que possam somar as já existentes e que, juntas, possam tornar mais eficiente o controle da mancha angular do feijoeiro. O controle biológico é uma dessas medidas estudadas (ROMEIRO; GARCIA, 2003; Romeiro, 2007a). Há inúmeros relatos da utilização de agentes de biocontrole com resultados muito promissores (MEYER; HÖFTE, 1997; YUEN, 2001; GARDENER, 2007; PERNEEL, 2008). Dentre esses agentes de biocontrole, bactérias residentes de filoplano têm demonstrado potencial para o manejo de doenças de plantas (BARGABUS et al., 2002; VIEIRA JÚNIOR, 2005; HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

O grande problema é que esses agentes de biocontrole, em sua maioria, são selecionados em ensaios prévios em casa de vegetação, e, em muitos casos, quando são levados a campo não se observa a reprodutibilidade do controle. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de cinco agentes de biocontrole no controle da mancha angular do feijoeiro, em condições de campo.

Material e Métodos

Antagonistas, sua origem e cultivo

Os microrganismos utilizados pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV. Como antagonistas usaram-se três isolamentos de *Bacillus cereus* UFV-172 e UFV075 isolados de filoplano de feijoeiro (VIEIRA JÚNIOR, 2005), UFV-101 isolado de rizosfera de tomateiro (SILVA et al., 2003) e dois isolamentos de *Pseudomonas putida* UFV-Pp isolado de filoplano de tomateiro (HALFELD-VIEIRA, 2002) e UFV-053 isolado de rizosfera de feijoeiro (MENDONÇA, 2006). Todos os isolamentos foram cultivados no meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) e, posteriormente, preservados por repicagem tubo-a-tubo sob óleo mineral (ROMEIRO, 2007b).

Ensaio de campo

Dois ensaios, um conduzido de fevereiro a junho de 2008 (ensaio 1) e outro de março a julho de 2008 (ensaio 2), foram montados em uma área experimental do Departamento de Fitopatologia da UFV, em Viçosa, MG. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, seis repetições, com oito tratamentos, UFV-172, UFV-101, UFV-075, UFV-053, UFV-Pp, acibenzolar-s-metil (ASM), fungicida clorotalonil e água, nos dois ensaios usaram-se os cultivares Pérola e Ouro Negro. Procedeu-se à semeadura em sulcos, utilizando a densidade de plantio de 14 sementes por metro, e o espaçamento entre sulcos de 60 cm, com 2,5 metros de comprimento, a adubação foi feita antes do plantio, seguindo-se a análise química do solo. Plantas no estágio V3 de desenvolvimento, segundo Fernández et al. (1985), citados por Santos e Gavilanes (2006), tiveram o seu filoplano atomizado com suspensão de propágulos das cinco

bactérias, com concentração ajustadas por absorvância ($OD_{540nm} = 0,4$), suspensão de ASM (150 mg.mL^{-1}) e clorotalonil (2 mg.mL^{-1}). Os tratamentos foram aplicados semanalmente até o fim do ensaio, que se deu no estágio R9. Avaliou-se a severidade da mancha angular, que ocorreu naturalmente, utilizando-se a escala diagramática proposta por Godoy et al. (1997).

Resultados

No ensaio conduzido de fevereiro à junho de 2008, a epidemia de mancha angular teve início aproximadamente aos 48 dias após a semeadura. Observou-se também a ocorrência de antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), cercosporiose (*Cercospora canescens*) e da mancha de alternaria (*Alternaria* sp.) nos dois cultivares testados; porém, não se caracterizaram como epidemia, uma vez que ocorriam em pontos isolados dentro dos blocos.

O progresso da mancha angular do feijoeiro foi reduzido para todos os tratamentos em comparação ao tratamento controle, quando o cultivar Pérola foi utilizado (Figura 1). Clorotalonil proporcionou melhor controle que os tratamentos UFV-101 e UFV-Pp, mas não houve diferença significativa entre o fungicida e os tratamentos ASM, UFV-172, UFV-075 e UFV-053 (Figura 1).

Para o cultivar Ouro Negro, todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle (Figura 2).

No ensaio conduzido de março a julho de 2008, a epidemia de mancha angular teve início aproximadamente aos 57 dias após a semeadura. Observou-se também a ocorrência de ferrugem (*Uromyces appendiculatus*), cerca de 45 dias após a emergência. Embora tenha ocorrido em caráter epidêmico, essa epidemia perdeu a importância com o início da mancha angular que, aos poucos, suprimiu a ferrugem.

No caso do cultivar Pérola, todos os tratamentos foram eficientes em reduzir o progresso da mancha angular comparados com o controle (Figura 3). Os isolamentos UFV-101, UFV-075, UFV-Pp e ASM foram estatisticamente inferiores ao controle químico e os isolamentos UFV-172 e UFV-053 não diferiram estatisticamente do fungicida clorotalonil. No cultivar Ouro Negro, também se observou o controle pelos tratamentos, em relação à testemunha (Figura 4). Os dois isolamentos de *P. putida* e ASM foram inferiores ao clorotalonil.

Discussão

A eficiência dos isolamentos de *B. cereus* e *P. putida* observados no neste trabalho confirma a potencialidade do controle biológico como método alternativo-complementar de controle de doença de plantas (BAKER; COOK, 1974; WINDELS; LINDOW, 1985; BETTIOL, 1991; ROMEIRO, 2007a). Os resultados apresentados nesse trabalho ratificam que é possível a utilização de agentes de biocontrole em campo, sem a perda da efetividade e contrariamente à opinião de que o controle biológico é questionável pela não reprodutibilidade.

O controle da mancha angular é muito difícil, seja pelo uso do controle químico, em que mesmo as novas moléculas recomendadas para o controle da doença não atingem um nível de controle desejável (SARTOTATO, 2007), seja pela resistência, em que é comum a sua quebra (FALEIRO et al., 2001; 2004). Ambos são fortemente afetados pela variabilidade do patógeno. Em um estudo de variabilidade de *P. griseola*, dentre vários patótipos do fungo oriundos de cinco estados brasileiros, um, denominado 63-63, foi capaz de suplantar a resistência de todos os cultivares diferenciadores (SARTORATO, 2002). Assim, os três isolamentos de *B. cereus* e os dois de *P. putida* demonstraram grande potencial para o manejo da mancha angular.

Os antagonistas mostraram-se aptos para colonizar o filoplano de plantas e resistir a fatores ambientais como a radiação UV, ventos e chuva a que foram expostos (HIRANO; UPPER, 2000; LINDOW; BRANDL, 2003) e, ainda assim sobreviver e promover o controle.

Lindow e Brandl (2003) relatam que pequenas alterações de temperatura e umidade são capazes de alterar toda a dinâmica do filoplano. E os dois ensaios foram montados em períodos bem diferentes, o que poderia afetar a colonização do filoplano e mesmo o controle (MANCEAU; KASEMPOUR, 2002). Esperava-se assim que pudesse haver uma diferença entre o controle exercido nos dois ensaios. Porém, o que se observou foi que, indiferentemente das condições ambientais expostas, as bactérias foram capazes de controlar a doença de forma muito semelhante. Com relação ao ativador químico ASM, este foi utilizado, pois mesmo com relatos da sua eficiência no controle de doenças do feijoeiro serem contraditórios (SIEGRIST et al., 1997, JESUS JÚNIOR et al., 1999; SOARES et al., 2004), ainda assim é registrado para o controle de doenças da cultura no Brasil. Para esse tratamento, parece os fatores ambientais, contribuíram, possivelmente a temperatura. Pois, no segundo ensaio, conduzido do

início do outono ao início do inverno, tendo acentuadas quedas de temperatura, controle de ASM em relação ao fungicida clorotalonil, foi inferior (Figuras 3 e 4), para os dois cultivares, o que não aconteceu no ensaio conduzido a partir do fim do verão (Figuras 1 e 2).

Referências

- Baker, K. F.; Cook, R. J. (1974). Biological control of plant pathogens. San Francisco, WH Freeman.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61: 289-298.
- Bettiol, W. (1991). Controle biológico de doenças do filoplanço. In: Bettiol, W. (Ed.). Controle biológico de doenças de plantas. 33-52
- Faleiro, F. G.; Nietsche, S.; Ragagnin, V. A.; Borém, A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2001). Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha angular em condições de casa-de-vegetação. *Fitopatologia Brasileira*. 26: 86-89.
- Faleiro, F. G.; Ragagnin, V. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2004). Use of molecular markers to accelerate the breeding of common bean lines resistant to rust and anthracnose. *Euphytica*. 138: 213-218.
- Gardener, B. B. M. (2007). Diversity and ecology of biocontrol *Pseudomonas* spp. in agricultural systems. *Phytopathology*. 97: 221-226.
- Godoy, C.V.; Carneiro, S.M.T.P.G.; Iamauti, M.T.; Pria, M.D.; Amorim, L.; Berger, R.D.; Bergamin Filho, A. (1997). Diagramatic scale for bean diseases: development and validation. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 101: 336-345.
- Halfeld-Vieira, B. A. H. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. 108 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Halfeld-Vieira, B. A.; Vieira Júnior, J. R.; Romeiro, R. S.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41: 1247-1252.

Hirano, S. S.; Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 624-653.

Kado, C. I.; Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-979.

Jesus Júnior, W. C., Romeiro, R. S., Rodrigues, F. A.; Pereira, J. L. A. (1999). Um derivado benzotiadiazólico como ativador químico de mecanismos de defesa em feijoeiro contra patógenos. *Fitopatologia Brasileira* 24: 293. (resumo).

Lindow, S. E.; Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1875-1883.

Manceau, C. R.; Kasempour, M. N. (2002). Endophytic versus epiphytic colonization of plants: what come first? In: Lindow, S. E.; Hecht-Pinar, E. I.; Elliott, V. J. (Eds.). *Phyllosphere microbiology*. pp.115-124.

Melo, C. L. P.; Ragagnin, V. A.; Arruda, K. M. A.; Barros, E. G.; Carneiro, P. C. S.; Paula Júnior, T. J.; Moreira, M. A.; Carneiro, J. E. S. (2008). Caracterização fenotípica e molecular de genitores de feijão tipo carioca quanto à resistência a patógenos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 43: 495-504.

Mendonça, H. L. Seleção de rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de resistência em feijoeiro. 2006. 67f Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Meyer, G.; Höfte, M. (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*. 87: 588-593.

Paula Júnior, T. J.; Vieira, R. F.; Chagas, J. M.; Carneiro, J. E. S.; Araújo, G. A. A.; Venzon, M.; Ramalho, M. A. P.; Abreu, A. F. B. A.; Andrade, M. J. B. (2007). Feijão. In: Paula Júnior, T. J.; Venzon, M. (Eds.). 101 culturas. Manual de tecnologias agrícolas. pp.331-342.

Paula Júnior, T. J.; Zambolim, L. (2006). Doenças. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds.). Feijão. 2^{ed}. pp.359-414.

Perneel, M.; D'hondt, L.; Maeyer, K.; Adiobo, A.; Rabaey, K.; Höfte, M. (2008). Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp. *Environmental Microbiology*. 10: 778-788.

Ragagnin, V. A.; Alzate-Marin, A. L.; Souza, T. L. P. O.; Arruda, K. M. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2003). Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 591-596.

Reis-Prado, F. G., Sartorato, A., Costa, J. G. C., Rava, C. A., Sibov, S. T., Pinheiro, J. B.; Carneiro, M. S. (2006). Reação de cultivares de feijoeiro comum à mancha angular em casa-de-vegetação. *Fitopatologia Brasileira* 31:306-309.

Romeiro, R. S. (2007a). Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S. (2007b). Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S.; Garcia, F. A. O. (2003). Controle biológico de enfermidades de plantas incitadas por bactérias. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 11: 195-227.

Rodrigues, F. A.; Fernandes, J. J.; Martins, M. (1999). Influência de semeaduras sucessivas de feijoeiro na severidade da mancha angular e ferrugem e perdas na produção. Pesquisa agropecuária brasileira. 34: 1373-1378.

Santos, J.B.; Gavilanes, M.L. (2006). Botânica. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T.J.; Borém, A. (Eds). Feijão. 2^{ed}. Viçosa. Editora UFV. pp.41-66.

Sartorato, A. (2006). Mancha angular do feijoeiro comum: controle químico com mistura de fungicida. Comunicado técnico. Brasília. EMBRAPA.

Sartorato, A. (2007). Controle químico da mancha angular do feijoeiro comum com o uso de novas moléculas. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. Brasília. EMBRAPA.

Sartorato, A.; Rava, C. A. (1992). Influência da cultivar e do número de inoculações na severidade da mancha angular (*Isariopsis griseola*) e nas perdas na produção do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris L.*). Fitopatologia Brasileira. 17: 247-251.

Sartorato, A.; Rava, C. A. (1994). Mancha angular. In: Sartorato, A.; Rava, C. A.(Eds.) Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. pp.41-68.

Sartorato, A.; Rava, C. A. (2003). Controle químico da mancha angular do feijoeiro comum. Summa Phytopathologica. 29: 202-204.

Sartorato, A. (2002). Identification of *Phaeoisariopsis griseola* pathotypes from five States in Brazil. Fitopatologia Brasileira. 27:078-081.

Silva, H. S. A.; Romeiro, R. S.; Mounteer, A. (2003). Development of a root colonization bioassay for rapid screening of rhizobacteria for potential biocontrol agents. Journal of Phytopathology. 151: 42-46.

Siegrist, J., Glenewinkel, D., Kollé, C.; Schimidtke, M. (1997). Chemically induced resistance in green bean against bacterial and fungal pathogens. Journal of Plant Disease and Protection 104:599-610.

Soares, R. M., Maringoni, A. C.; Lima, G. P. P. (2004). Ineficiência de acibenzolar-S-methyl na indução de resistência de feijoeiro à murcha-de-Curtobacterium. *Fitopatologia Brasileira* 29:373-377.

Vieira, C. (1988). *Doenças e pragas do feijoeiro*. Viçosa: Imprensa Universitária UFV.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Yokoyama, L. P. (2002). O feijão no Brasil no período de 1984/85 a 1999/00: Aspectos conjunturais. In: Vieira, C. (Ed.). VII CONAFE- Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. pp.654-657,

Yuen, Y; Steadman, J. R.; Lindgren, D. T.; Schaff, D.; Jochum, C. (2001). Bean rust biological control using bacterial agents. 20 : 395-402.

Windels, C. E.; Lindow, S. E. (1985). *Biological control on the phylloplane*. St. Paul. APS Press.

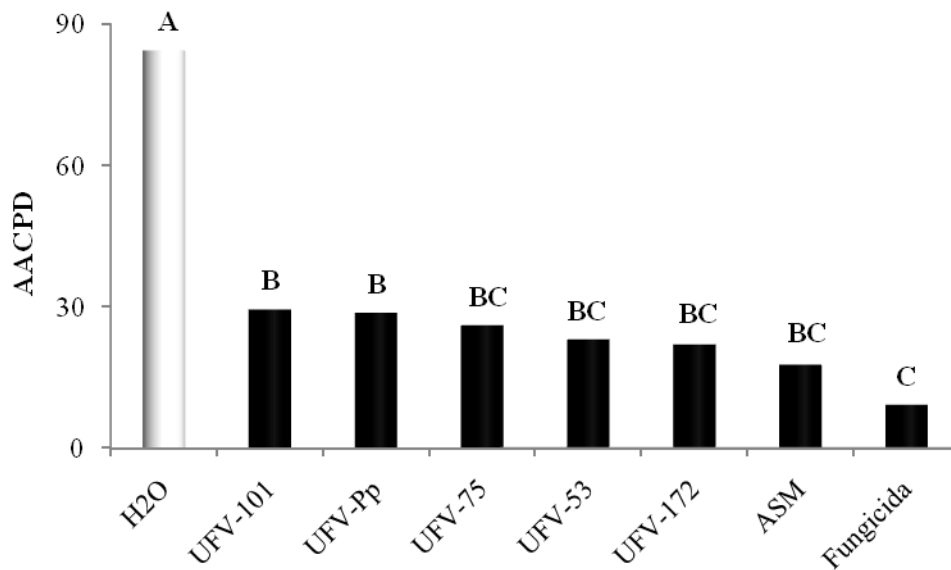


Figura 1 – Efeito dos isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *Pseudomonas putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre o progresso da mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), para o cultivar Pérola no ensaio conduzido de fevereiro a junho de 2008. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. ASM = Acibenzolar-s-metil. Fungicida = Fungicida clorotalonil

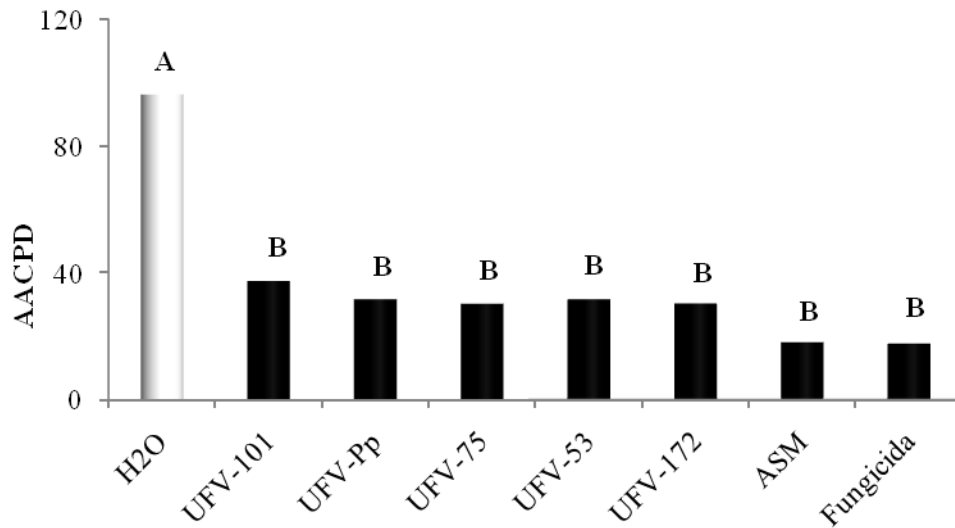


Figura 2 – Efeito dos isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *Pseudomonas putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre o progresso da mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), para o cultivar Ouro Negro, no ensaio conduzido de fevereiro a junho de 2008. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. ASM = Acibenzolar-s-metil. Fungicida = Fungicida clorotalonil

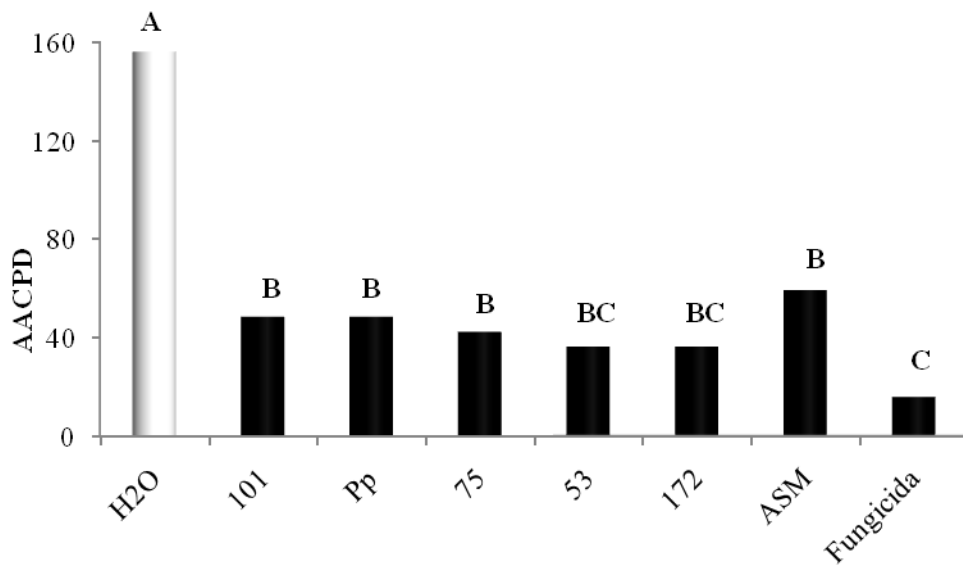


Figura 3 – Efeito dos isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *Pseudomonas putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre o progresso da mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), para o cultivar Pérola, no ensaio conduzido de março a julho de 2008. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. ASM = Acibenzolar-s-metil. Fungicida = Fungicida clorotalonil

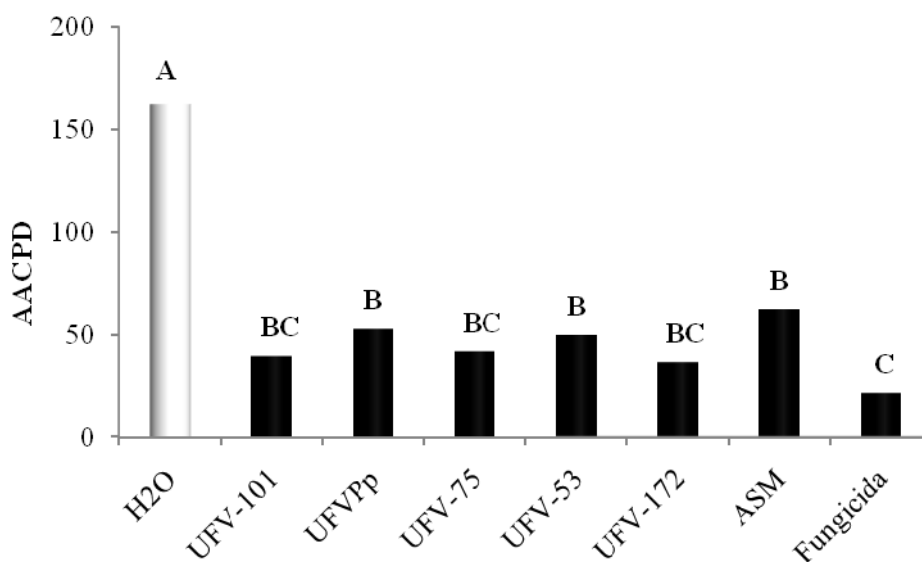


Figura 4 – Efeito dos isolamentos de *Bacillus cereus* (UFV-172, UFV-101, UFV-075) e de *Pseudomonas putida* (UFV-053 e UFV-Pp) sobre o progresso da mancha angular (*Pseudocercospora griseola*), para o cultivar Ouro Negro, no ensaio conduzido de março a julho de 2008. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. ASM = Acibenzolar-s-metil. Fungicida = Fungicida clorotalonil

CAPÍTULO 5

Controle da Ferrugem do Feijoeiro (*Uromyces appendiculats*) pela Co-dispensa de Procariotas Previamente Selecionados, em dois cultivares

Resumo

O feijão é uma das principais culturas plantadas no Brasil e uma das bases da alimentação do povo brasileiro. Embora configure como um dos maiores produtores da cultura, o país sofre com as perdas, sobretudo as relacionadas a patógenos. A ferrugem do feijoeiro é uma das principais doenças que ocorre na cultura, podendo levar a perdas de até 50%. O controle baseia-se no uso de cultivares resistentes, que, em muitos casos, apresentam problemas relacionados à variabilidade do patógeno. O controle químico, embora seja eficiente, é caro e, para pequenos produtores, torna-se inviável. Assim, o controle biológico tem sido estudado como uma alternativa dentro do conjunto de medidas de manejo da doença. Bactérias são os mais comuns e utilizados agentes de biocontrole. Em geral, usa-se um agente de biocontrole por vez, raramente encontram-se relatos de mais de um antagonista sendo usado simultaneamente. O emprego de agentes de biocontrole relacionados em conjunto tem sido proposto como uma alternativa para aumentar a eficiência do controle exercido por esses agentes. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência de dois agentes de biocontrole de feijoeiro, um residente de filoplano *Bacillus cereus* (UFV-075) e uma rizobactéria *Pseudomonas putida* (UFV-053), quando dispensados em conjunto, no filoplano e na rizosfera de plantas de feijoeiro, respectivamente e quando dispensados sozinhos no controle da ferrugem e o seu efeito na produção, em condições de campo. Os resultados mostraram que, nas condições testadas, a co-dispensa não foi capaz de aumentar a eficiência do controle e nem efeito na produção.

Bean rust (*Uromyces appendiculatus*) control by the simultaneous deliver of previously selected prokaryotes to two distinct cultivars

Abstract

Bean is one of the most important crops in Brazil as food source and, in spite of the fact that the country is an important producer worldwide, there are significant losses to pathogens. The bean rust, for instance, may cause losses up to 50%. Nowadays, control is mostly based either on genetic resistance with low efficiency due to problems related to pathogen genetic variability or on chemicals that are expensive and come along residues and ecological problems. The biological control has been investigated as an alternative encompassed by other integrated disease control management procedures. In this respect, bacteria are the biocontrol agents more frequently used but reports on the use of more than one biocontrol agent used at the same time are not frequent and the simultaneous deliver of biocontrol agents might be an alternative to maximize efficiency. This paper deals with an attempt to use a phylloplane resident (*Bacillus cereus*, isolate UFV-075) delivered to bean phylloplane by spraying at same time that a rhizobacterium (*Pseudomonas putida*, isolate UFV-053), in order to verify whether this combination would be beneficially synergistic in terms of biocontrol. A field experiment indicated that, under field conditions, the simultaneous deliver of both biocontrol agents did not improve the efficiency of the biocontrol.

Introdução

O feijoeiro, é uma das principais culturas plantadas no Brasil, é, juntamente com o arroz, a base da alimentação do povo brasileiro. Os plantios de feijão encontram-se distribuídos por todo o território nacional (BORÉM; CARNEIRO, 2006). Embora o país tenha uma extensa área plantada, cerca de 4,3 milhões de hectares (YOKOYAMA, 2002), a produtividade é altamente comprometida por alguns fatores, dentre eles as doenças que acometem a cultura, sendo relatadas mais de uma centena (HALL, 1994; SARTORATO; RAVA, 1994).

A ferrugem, causada por *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger é uma das mais importantes e destrutivas doenças do feijoeiro no Brasil SARTORATO; RAVA, 1994). As perdas provocadas por *U. appendiculatus* no país são da ordem de 50 % (VIEIRA, 1988; SARTORATO; RAVA, 1994; VALE; ZAMBOLIM, 1997).

O controle da doença baseia-se no uso de cultivares resistentes (VALE; ZAMBOLIM, 1997, FALEIRO et al., 2001, RAGAGNIN et al., 2003). Entretanto, devido à grande variabilidade do patógeno, os genótipos testados, em sua maioria, tem se mostrado suscetíveis e mesmo as linhagens resistentes têm apresentado sérios problemas quando são levadas a campo. Sartorato e Rava (1994), assim como Agrios (2005), relatam que existem mais de duzentas raças de *U. appendiculatus* descritas no mundo.

Apesar de o controle químico ser considerado um método efetivo, com bons ganhos na produtividade, este tem sido preferido, em parte, pelo uso de cultivares com certo nível de resistência, ou também pelo baixo nível tecnológico aplicado à cultura por pequenos e médios produtores e pelo aumento nos custos de produção, não compensados pelos preços alcançados pelo produto (KYIUNA; ASSUMPÇÃO, 2002; RODRIGUES; VIEIRA, 2002).

A busca por medidas complementares ao uso do controle químico e cultivares resistentes, dentro de um contexto de manejo integrado, se justifica. O controle biológico é uma dessas medidas que têm sido propostas (NORDLUND, 1996; BUCHENAUER, 1998; ROMEIRO et al., 2000; MADER et al., 2002).

Em se tratando do controle biológico em condições de campo, existe a preocupação de que, em alguns casos, os isolamentos não apresentem o mesmo desempenho, quando da seleção destes que, geralmente se faz *in vitro*, ou *in vivo* sob condições ambientais controladas, ou não representativas da realidade de campo. Esse

aspecto é importante quando se trata do uso de microrganismos para o controle de doenças no filoplano (SLEESMAN; LEBEN, 1976; MARIANO, 1993), embora existam diversos exemplos de microrganismos que controlaram com êxito patógenos em diferentes culturas, em condições de campo (KORSTEN et al., 1997; MASANGKAY et al., 1999; ZHANG; YUEN, 1999; KAZMAR et al., 2000).

Alguns trabalhos foram desenvolvidos visando ao controle biológico da ferrugem (MIZUBUTI et al., 1995; YUEN et al., 2001). Porém, na maioria desses, utiliza-se geralmente um único agente de biocontrole, e quando se usa mais de um, raramente estuda-se o efeito da utilização desses, de maneira combinada.

Com base nestes argumentos, objetivou-se neste trabalho testar a eficiência de controle de dois isolamentos de procariotas, um residente de filoplano e uma rizobactéria, ambos isolados de plantas sadias de feijão, no controle da ferrugem do feijoeiro e o seu efeito na produção em condições de campo.

Material e Métodos

Microrganismos, sua origem e cultivo

Os antagonistas utilizados pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV. O isolamento UFV-075 de *Bacillus cereus* foi previamente isolado do filoplano e selecionado como promissor agente de biocontrole de doenças do feijoeiro (VIEIRA JÚNIOR, 2005). O isolamento UFV-053 de *Pseudomonas putida* é autóctone da rizosfera de feijoeiro e demonstrou ser um bom agente de controle de doenças da cultura (MENDONÇA, 2006). As bactérias foram cultivadas no meio 523 (KADO; HESKETT 1970), e, posteriormente preservadas por repicagem tubo-a-tubo e sob óleo mineral (ROMEIRO, 2007b).

Preparo da suspensão de propágulos dos microrganismos

Os antagonistas foram cultivados em meio 523 (KADO; HESKETT 1970), sólido, por 20 horas, a 28 °C. Foram então coletados com o auxílio de alça de Drygalski e suspensos em água tendo sua concentração ajustada para densidade óptica de 0,4 a 540 nm e, posteriormente, dispensadas em sementes ou no filoplano de feijoeiro, conforme o tratamento.

Ensaio de campo

O ensaio foi montado no município de Campos dos Goytacazes, RJ, no período de janeiro a março de 2006. Utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, sendo quatro blocos com dez plantas por parcela. Os tratamentos usados foram sementes microbiolizadas com propágulos do isolamento UFV-053 ($OD_{540} = 0,4$), plantas atomizadas semanalmente com propágulos de UFV-075 ($OD_{540} = 0,4$), plantas atomizadas semanalmente com propágulos de UFV-053 ($OD_{540} = 0,4$), plantas atomizadas semanalmente com suspensão de fungicida Clorotalonil ($0,075g.L^{-1}$) e plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-053 ($OD_{540} = 0,4$) e posteriormente, atomizadas semanalmente com UFV-075 ($OD_{540} = 0,4$). No tratamento controle, as plantas foram atomizadas com água. Os cultivares utilizados foram Pérola e Diamante Negro. A escolha do cultivar Diamante Negro e não Ouro Negro, como ocorreu nos outros capítulos do trabalho, foi pelo fato de o segundo não ser recomendado para o plantio das águas (PAULA JÚNIOR et al., 2007).

Para os dois cultivares avaliou-se, semanalmente, a severidade da ferrugem, que ocorreu naturalmente a partir do 14º dia após a emergência de plantas até o 56º dia, calculando-se a área abaixo da curva de progresso de doença (AACPD). Também foram avaliados o efeito do incremento na produção, através da média de sementes por plantas, e a produção média por planta em gramas.

Resultados e Discussão

Nos dois cultivares, observou-se a ocorrência natural de epidemia de ferrugem. Para o cultivar Pérola, todos os tratamentos reduziram o progresso da ferrugem, em comparação ao controle, sendo que apenas a co-dispensa dos agentes de biocontrole controlou a doença no mesmo nível do fungicida (Figura 1). Para o cultivar Diamante Negro, houve redução do progresso da doença em face do tratamento controle, sendo o fungicida superior aos demais tratamentos (Figura 2).

O efeito dos antagonistas sobre a produção foi observado em duas situações: na co-dispensa e quando os antagonistas foram dispensados individualmente (Figuras 3, 4, 5 e 6). No cultivar Pérola, o tratamento UFV-053 atomizado foi menos eficiente em aumentar no número de sementes (Figura 3) e, em relação ao peso de sementes, não diferiu estatisticamente do controle (Figura 4). Para o cultivar Diamante Negro, em

relação ao para peso de sementes, somente o isolamento UFV-075 quando atomizado não diferiu estatisticamente do fungicida. Porém, os demais foram produziram mais sementes que o controle. Quanto ao peso médio de sementes por planta, todos os tratamentos foram estatisticamente iguais e superiores ao controle água.

No biocontrole da ferrugem, os resultados mostram que a co-dispensa dos dois agentes de bicontrol não foi capaz de aumentar a eficiência do controle. A aplicação de grupos de microrganismos relacionados tem sido postulada como uma alternativa para a melhoria da eficiência do controle biológico exercido por microrganismos (BASHAN, 1998). Assim, tem-se tentado a utilização em conjunto de leveduras e bactérias (GUETSKY et al., 2001), leveduras e leveduras (ELAD et al., 1994), bactérias e bactérias (Jensen et al, 2002). O que se espera é que haja uma interação entre os dois agentes de biocontrole, favorendo a colonização de ambos e, por conseguinte, aumentando o controle. Provavelmente, não houve essa interação. Outro ponto importante é que não se sabe se quando dispensados na rizosfera e, ou, no filoplano, ao colonizar esses *habitats*, essas bactérias tenham a capacidade para migrar e colonizar outro *habitats*. Em geral, quando se faz a co-dispensa aplicam-se os dois agentes de biocontrole no mesmo *habitat* e, ao mesmo tempo, diferindo do que foi realizado aqui (ELAD et al., 1994; GUETSKY et al., 2001; JENSEN et al, 2002). Carrer Filho (2002), trabalhando com um isolamento de *Streptomyces setonii* e um de *Nocardioides thermolinacinus*, também observou que a co-dispensa dos dois antagonistas, um no filoplano, outro na rizosfera, não aumentou a eficiência do controle da pinta preta do tomateiro (*Alternaria solani*), exercidos pelos dois antagonistas. Assim, é possível que essa separação espacial impeça o contato entre os dois agentes de biocontrole e a sua interação.

Quanto ao incremento na produção, acredita-se que tenha ocorrido graças à menor severidade de doença que ocorreu pela ação dos antagonistas. Esse efeito tem sido relatado por alguns autores como de promoção de crescimento por meio de mecanismos indiretos de promoção (ROMEIRO, 2007a).

Referências

- Agrios, G. N. (2005). Plant Pathology. 6^{ed}. San Diego. Academic Press.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16: 729-770.
- Borém, A.; Carneiro, J. E. S. (2006). A cultura. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds). *Feijão*. 2^{ed}. pp.13-19.
- Buchenauer, H. (1998). Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *Journal of Plant Disease Protection*. 105: 329-348.
- Elad, Y., Köhl, J.; Fokkema, N. J. (1994). Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic yeasts. *Phytopathology*. 84: 1193-1199.
- Carrer Filho, R. Actinomicetos como agentes de biocontrole de doenças e como promotores de crescimento do tomateiro. 2002. 78 f. Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- Faleiro, F. G.; Nietsche, S.; Ragagnin, V. A.; Borém, A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2001). Resistência de cultivares de feijoeiro-comum à ferrugem e à mancha angular em condições de casa-de-vegetação. *Fitopatologia Brasileira*. 26: 86-89.
- Guetsky, R.; Shtienberg, D.; Elad, Y.; Dinoor, A. (2001). Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology*. 97: 621-627.
- Hall, R. E. (1994). *Compendium of Bean Diseases*, St. Paul. APS Press.
- Jensen, C. E.; Percich, J. A.; Graham, P. H. (2002). Integrated management strategies of bean root rot with *Bacillus subtilis* and *Rhizobium* in Minnesota. *Fields Crops Research*. 74: 107-115.

Kado, C. I.; Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-979.

Kazmar, E. R.; Goodman, R. M.; Grau, C. R.; Johnson, D. W.; Nordheim, E. V.; Undersander, D. J.; Handelsman, J. (2000). Regression analyses for evaluating the influence of *Bacillus cereus* on alfalfa yield under variable disease intensity. *Phytopathology*. 90: 657-665.

Kiyuna, I.; Assumpção, R. (2002). El Niño- oscilação sul e o mercado de feijão no Brasil. In: Vieira, C. (Ed.). VII CONAFE- Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. pp.650-653.

Korsten, L.; De Villiers, E. E.; Wehner, F. C.; Kotze, J. M. (1997). Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit diseases of avocado in south Africa. *Plant Disease*. 81: 455-459.

Mader, P.; Flieback, A.; Dubois, D.; Gunst, L.; Fried, P.; Niggli, U. (2002). Soil fertility and biodiversity in organic farming. *Science*. 296: 1694-1697.

Mariano, R. L. R. (1993). Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. 1: 369-409.

Masangkay, R. F.; Paulitz, T. C.; Hallett, S. G.; Watson, A. K. (1999). Factors influencing biological control of *Sphenoclea zeylanica* with *Alternaria alternata* f. sp. *sphenocleae*. *Plant Disease*. 83: 1019-1024.

Mendonça, H. L. Seleção de rizobactérias promotoras de crescimento e indutoras de resistência em feijoeiro. 2006. 67f Dissertação (Mestrado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Mizubuti, E. S. G; Maffia, L. A.; Muchovej, J. J.; Romeiro, R. S.; Batista, U. G. (1995). Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust. *Fitopatologia Brasileira*. 20: 540-544.

Nordlund, D. A. (1996). Biological control, integrated pest management and conceptual models. *Biocontrol News and Information*. 17: 35-44.

Paula Júnior, T. J.; Vieira, R. F.; Chagas, J. M.; Carneiro, J. E. S.; Araújo, G. A. A.; Venzon, M.; Ramalho, M. A. P.; Abreu, A. F. B. A.; Andrade, M. J. B. (2007). Feijão. In: Paula Júnior, T. J.; Venzon, M. (Eds.). 101 culturas. Manual de tecnologias agrícolas. pp.331-342.

Ragagnin, V. A.; Alzate-Marin, A. L.; Souza, T. L. P. O.; Arruda, K. M. A.; Moreira, M. A.; Barros, E. G. (2003). Avaliação da resistência de isolinhas de feijoeiro a diferentes patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Uromyces appendiculatus* e *Phaeoisariopsis griseola*. *Fitopatologia Brasileira*. 28: 591-596.

Rodrigues, O. L. e Vieira, R. F. (2002). Ganhos em produtividade com o uso de fungicidas em cultivares/linhagens de feijão com diferentes reações a doenças. In: Vieira, C. (Ed.). VII CONAFE- Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. pp.172-175.

Romeiro, R. S. (2007a). Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S. (2007b). Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S.; Neves, D. M. S.; Carvalho, M. G.; Carrer Filho, R. (2000). Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. *Summa Phytopathologica*. 26: 220-224.

Sartorato, A.; Rava, C. A. Mancha angular. (1994). In: Sartorato, A.; Rava, C. A. (Eds.) Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. pp. 41-68.

Sleesman, J. P.; Leben, C. (1976). Microbial antagonists of *Bipolaris maydis* *Phytopathology*. 19: 1214-1218.

Vale, F. X. R.; Zambolim, L. (1997). Controle de doenças de plantas - Grandes culturas. Visconde do Rio Branco: Suprema Gráfica e Editora Ltda.

Vieira, C. (1988). Doenças e pragas do feijoeiro. Viçosa. Imprensa Universitária UFV.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Yuen, G. Y.; Steadman, J. R.; Lindgren, D. T.; Scha, D.; Jochum, C. (2001). Bean rust biological control using bacterial agents. *Crop Protection*. 20: 395-402.

Yokoyama, L. P. (2002). O feijão no Brasil no período de 1984/85 a 1999/00: Aspectos conjunturais. In: Vieira, C. (Ed.). VII CONAFE- Congresso Nacional de Pesquisa de Feijão. pp.654-657,

Zhang, Z.; Yuen, G. Y. (2000). The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophila* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. *Phytopathology*. 90: 384-389.

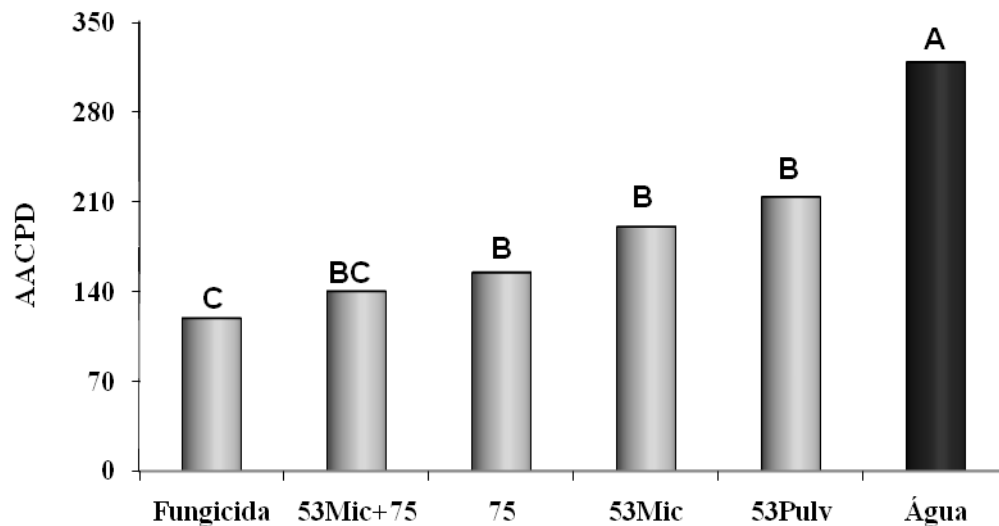


Figura 1. – Efeito do isolamento UFV-075 de *Bacillus cereus* e UFV-053 de *Pseudomonas putida* sobre o progresso de ferrugem do feijoeiro, em plantas do cultivar Pérola. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. 53Pulv = Plantas atomizadas com UFV-053; 75 = Plantas atomizadas com UFV-075; 53Mic = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53; 53Mic+75 = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53 e, posteriormente, atomizadas com UFV-075; Fungicida = fungicida clorotalonil.

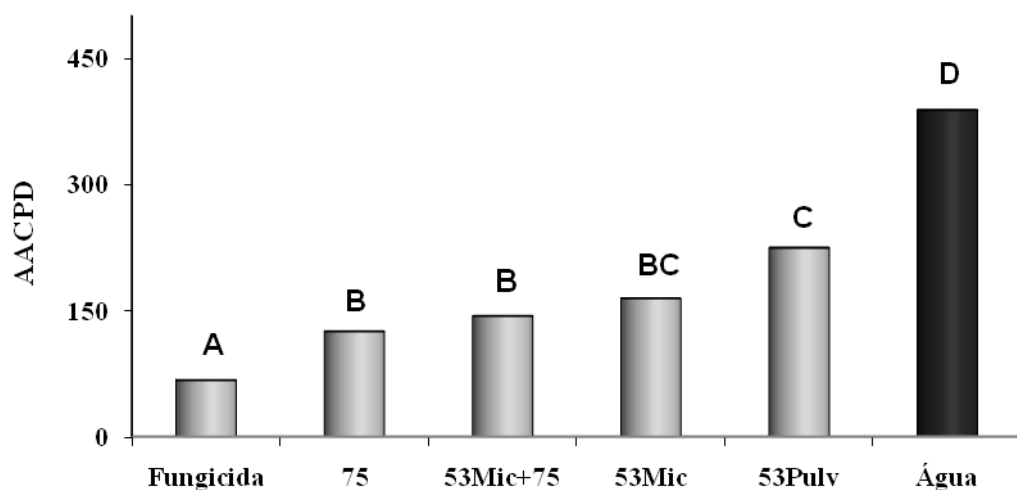


Figura 2. – Efeito do isolamento UFV-075 de *Bacillus cereus* e UFV-053 de *Pseudomonas putida* sobre o progresso de ferrugem do feijoeiro, em plantas do cultivar Diamante Negro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. 53Pulv = Plantas atomizadas com UFV-053; 75 = Plantas atomizadas com UFV-075; 53Mic = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53; 53Mic+75 = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53 e, posteriormente, atomizadas com UFV-075; Fungicida = fungicida clorotalonil.

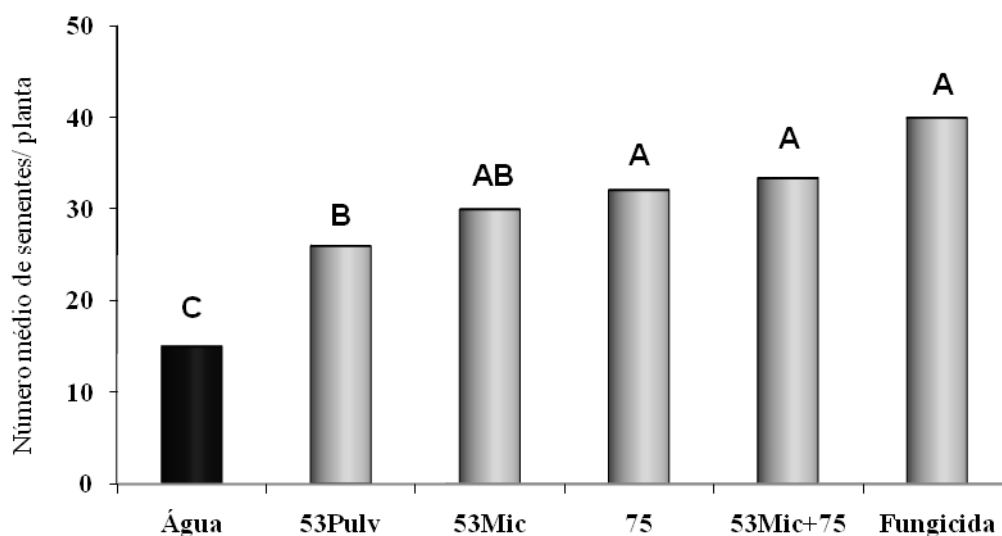


Figura 3. – Efeito do isolamento UFV-075 de *Bacillus cereus* e UFV-053 de *Pseudomonas putida* sobre a produção de sementes dada pelo número médio de sementes por planta, para o cultivar Pérola. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. 53Pulv = Plantas atomizadas com UFV-053; 75 = Plantas atomizadas com UFV-075; 53Mic = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53; 53Mic+75 = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53 e, posteriormente, atomizadas com UFV-075; Fungicida = fungicida clorotalonil.

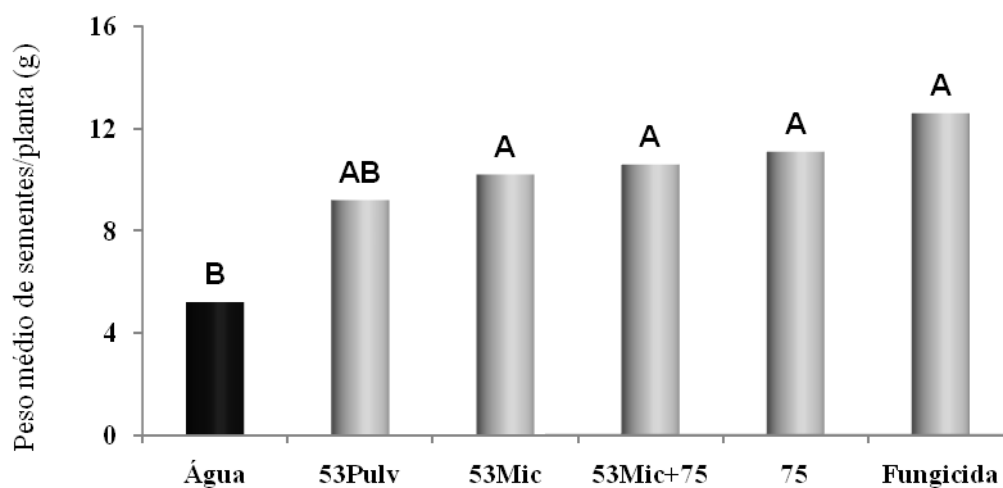


Figura 4. – Efeito do isolamento UFV-075 de *Bacillus cereus* e UFV-053 de *Pseudomonas putida* sobre a produção de sementes dada pelo peso médio de sementes por planta, para o cultivar Pérola. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. 53Pulv = Plantas atomizadas com UFV-053; 75 = Plantas atomizadas com UFV-075; 53Mic = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53; 53Mic+75 = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53 e, posteriormente, atomizadas com UFV-075; Fungicida = fungicida clorotalonil.

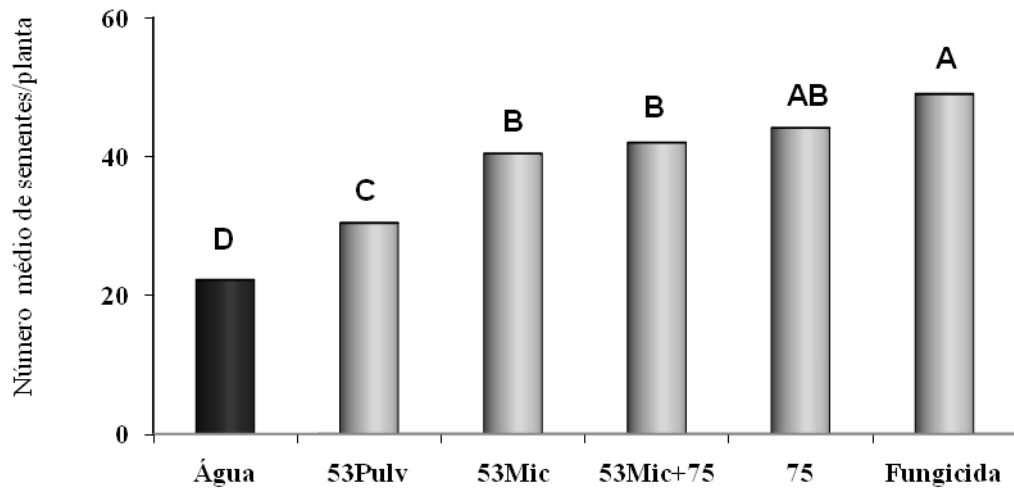


Figura 5. – Efeito do isolamento UFV-075 de *Bacillus cereus* e UFV-053 de *Pseudomonas putida* sobre a produção de sementes dada pelo número médio de sementes por planta, para o cultivar Diamante Negro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. 53Pulv = Plantas atomizadas com UFV-053; 75 = Plantas atomizadas com UFV-075; 53Mic = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53; 53Mic+75 = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53 e, posteriormente, atomizadas com UFV-075; Fungicida = fungicida clorotalonil.

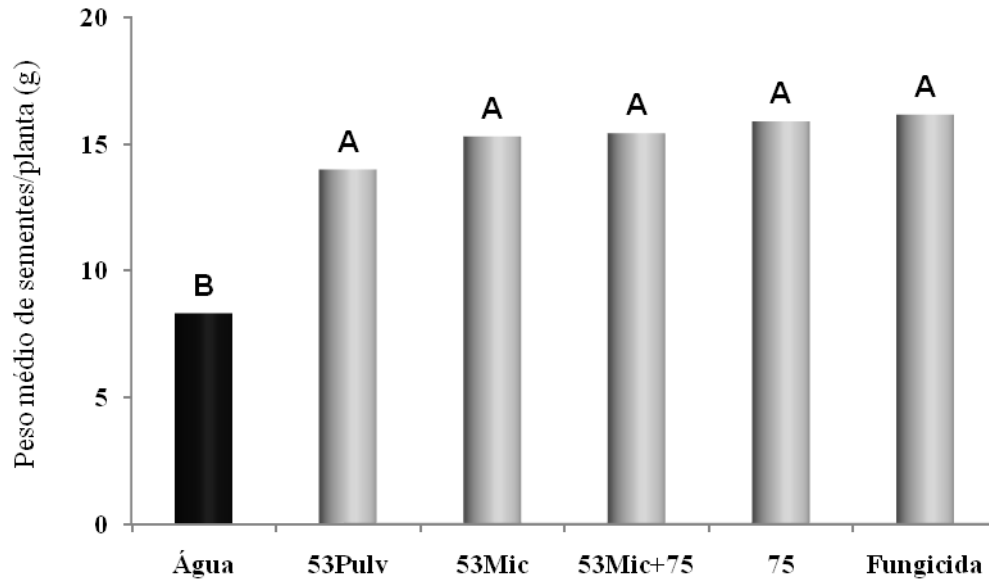


Figura 6. – Efeito do isolamento UFV-075 de *Bacillus cereus* e UFV-053 de *Pseudomonas putida* sobre a produção de sementes dada pelo peso médio de sementes por planta, para o cultivar Diamante Negro. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%. 53Pulv = Plantas atomizadas com UFV-053; 75 = Plantas atomizadas com UFV-075; 53Mic = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53; 53Mic+75 = Plantas oriundas de sementes microbiolizadas com UFV-53 e, posteriormente, atomizadas com UFV-075; Fungicida = fungicida clorotalonil.

CAPÍTULO 6

Competição por Nutrientes e por Nichos Ecológicos como Possíveis Mecanismos de Biocontrole do Crestamento Bacteriano Comum do Feijoeiro por um Isolamento de *Bacillus cereus*.

Resumo

O crestamento bacteriano comum do feijoeiro, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*), é uma doença muito importante para a cultura do feijão no Brasil. As medidas de controle atualmente recomendadas são de baixa eficácia, o que torna importante a busca por medidas de manejo que visem reduzir os danos causados. O controle biológico tem sido uma alternativa promissora para o manejo dessa doença, principalmente pelo uso de bactérias. O mecanismo de ação dessas bactérias é diversificado, ou seja, elas podem atuar tanto por mecanismos diretos, como indiretos. É, portanto, importante conhecer a forma como o antagonismo é exercido. Objetiva-se neste trabalho avaliar a competição por nutrientes e, ou, por nichos como um dos possíveis mecanismos de controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro, pelo isolamento UFV-172 de *Bacillus cereus*. Inicialmente, fez-se a seleção *in vitro* de um isolamento de *Xap*, insensível a compostos antimicrobianos sintetizados pelo antagonista UFV-172. Estudos de competição por nicho foram realizados em dois ensaios. No primeiro, vagens de feijão foram expostas a células do antagonista e, após um dia, inoculadas por injeção com propágulos do patógeno selecionado no ensaio *in vitro*. No segundo, foi feito um fermento em vagens, e, sobre esse fermento, foi depositada uma gota de suspensão de propágulos do antagonista. Após um dia, essa gota foi removida, e, no mesmo sítio, o patógeno foi inoculado. Nos dois ensaios, avaliou-se a área lesionada. O estudo da competição por nutrientes foi realizado em microplacas contendo diversas fontes nutricionais (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre), em um total de 379 fontes avaliadas. Nos dois ensaios com vagens, o isolamento UFV-172 reduziu a área lesionada. No ensaio com as microplacas, observou-se que 50,4% (191) das fontes (carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre) eram de uso comum. Os resultados fornecem indícios de que a competição por nicho e, ou, nutrientes pode estar envolvida no biocontrole do crestamento bacteriano comum do feijoeiro em vagens.

Nutrient and ecological niche competitiveness as possible biocontrol mechanisms for the bacterial bean blight promoted by an isolate of *Bacillus cereus*

Abstract

The common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, *Xap*) is an important bean disease in Brazil and recommended control measures always present low efficacy, what makes an important task to look for other disease management procedures aiming to reduce crop yield losses. The biological control may turn into a promising disease management procedure, mainly by using bacteria as agents. This paper had as purpose to investigate whether competitiveness for both nutrient and ecological niche would be one of the mechanisms involved in the observed biocontrol promoted by isolate UFV-172 of *Bacillus cereus*. Initially, an isolate of *Xap* that was insensitive to antimicrobial substances produced by isolate UFV-172 was selected. Competition for niches was studied in two assays. In the first, detached bean pods were exposed to propagules of isolate UFV-172 and, one day later, the pathogen was inoculated by injection. In the second one, in wounds made in pod surfaces, a drop of propagule suspension of the antagonist was applied; one day later, the drop was removed and a drop of inoculum suspension was applied. In both assays, lesion area was estimated and, in both assays, biocontrol reduced lesion areas. Investigation on competition for nutrients was accomplished by using Biolog individual microplate sets for sources of Carbon, Nitrogen, Phosphorus and Sulfur, in a total of 379 nutrient sources studied. Results indicated that around 50,4% (191) nutrient sources were used by both pathogen and biocontrol agent. Overall results indicated that for nutrients and, or, for ecological niches might be among biocontrol mechanisms observed in the case of the biocontrol of common bacterial blight in bean under investigation.

Introdução

O feijoeiro é atacado por mais de uma centena de patógenos (HALL, 1994). No Brasil, o crestamento bacteriano comum, causado por *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Xap) é, junto com a ferrugem e a mancha angular uma das principais doenças da cultura (PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006). Diante das dificuldades apresentadas pelas medidas de controle tradicionalmente empregadas (MARINGONI, 1990; PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIM, 2006), o controle biológico é uma alternativa para o manejo do crestamento bacteriano comum. Romeiro (2007a) relata vários casos de sucesso no uso de procariontes como agentes de controle biológico de doenças de plantas. Dentre esses, residentes de filoplano têm demonstrado grande potencial no controle de várias doenças (ROMEIRO; GARCIA, 2007). Essas bactérias podem atuar no controle biológico de doenças de plantas, tanto por antagonismo direto (HALFELD-VIEIRA, 2002; MACAGNAN, 2005; VIEIRA JÚNIOR, 2005) como pela indução de resistência (BARGABUS et al., 2002; 2003; 2004; HALFELD-VIEIRA et al., 2006).

São vários os mecanismos de antagonismo direto envolvidos no controle, dentre estes podem-se citar dois importantes, ou seja, a competição por nicho ecológico e competição por nutrientes (ROMEIRO, 2007a).

A competição pode ser entendida como uma interação entre dois ou mais organismos, ou duas ou mais populações, que disputam algum fator essencial ao seu desenvolvimento, de forma que essa interação em alguns casos pode, inclusive, levar à exclusão do indivíduo ou da população (BETTIOL, 1991; ATLAS; BARTHA, 1998; SOMEYA; AKUTSU, 2006). Embora conceitualmente a competição por nicho e a nutricional sejam duas coisas completamente distintas, usualmente é difícil separar os efeitos dos dois mecanismos quando se estuda a interação entre dois organismos, por estarem intimamente ligados (BOLWERK; LUGTENBERG, 2006). Janisiewicz et al. (2000), propuseram um método para o estudo de competição por nutrientes, em que o antagonista é cultivado em meio líquido e colocado em um suporte de acrílico com uma membrana de 45 µm de poro, capaz de reter as células do antagonista, mas permitindo o livre fluxo de líquidos e dos metabólitos sintetizados pelo antagonista. Cultivava-se o patógeno desafiante (*Penicillium expansum*) em meio líquido sobre um suporte de acrílico que permitia a inserção nele do sistema supracitado, de forma que o antagonista e o patógeno sejam cultivados ao mesmo tempo, separados apenas pela membrana. Nessas condições, não se observou a inibição da germinação de conídios do patógeno

desafiante, pelo antagonista. Isso evidenciava a ausência de antibiose ao patógeno pelo antagonista. Porém, quando a membrana era retirada e não havia barreira física entre os dois microrganismos, observava-se a inibição da germinação dos conídios de *P. expansum* efeito que os autores atribuíram à competição por nutrientes. Em um estudo feito com microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que dois isolamentos de *Pseudomonas* sp., selecionados como agentes de controle biológico, quando dispensados em raízes de tomateiro, competiam por nicho com o patógeno desafiante *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (BOLWERK, et al., 2003).

Objetivou-se, neste trabalho avaliar se a competição por nutrientes e, ou, por nicho está envolvida no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro pelo isolamento UFV-172 de *Bacillus cereus*.

Material e Métodos

Microrganismos, sua origem e cultivo

Os isolamentos de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (*Xap*) e o isolamento de *Bacillus cereus* UFV-172 são oriundos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV. Os microrganismos foram cultivados em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), e, posteriormente, preservados por repicagem tubo-a-tubo, sob óleo mineral (ROMEIRO, 2007b).

Antibiose *in vitro*

Inicialmente, realizou-se um ensaio para a seleção de isolamentos de *Xap* resistentes aos compostos antimicrobianos sintetizados pelo antagonista UFV-172, empregando-se a metodologia proposta por Azevedo (1998), com modificações. Para isso, utilizaram-se 13 isolamentos do patógeno (02A, 02B, 04A, 04B, 05A, 05B, 06B, 07A, 07B, 5, 5.3, 8, 9 e Xap1). Cultivou-se o patógeno em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), líquido, a 28 °C por 24 horas. Após, foram incorporados 100 µL do crescimento bacteriano ao meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), sólido, em estado fundente (aproximadamente 48 °C), vertendo-o em placas de Petri. Após a solidificação, foi depositada sobre sua superfície uma folha de papel celofane poroso, de forma a cobrir toda a superfície do meio de cultura. Sob esse papel, verteram-se 100 µL de

propágulos do antagonista, crescidos em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) a 28 °C, por 24 horas. As placas foram mantidas por 24 horas a 28 °C e, após, retirou-se o papel celofane e avaliou a presença ou ausência de halo de inibição. O ensaio foi montado com três repetições no delineamento inteiramente casualizado.

Biocontrole experimental em vagens de feijão para evidência de competição por nicho ecológico

Foram montados dois ensaios com vagens de feijoeiro. No primeiro, as vagens foram lavadas e desinfestadas em álcool (50%), por 30 segundos, e hipoclorito de sódio (2%) por 3 minutos, e enxaguadas com água esterilizada. Após a secagem, foi dispensada sobre sua superfície uma suspensão de propágulos do antagonista ($OD_{540nm} = 0,4$), por imersão. Transcorridas 24 horas, as vagens foram inoculadas em três pontos equidistantes, por meio de infiltração com o auxílio de seringa hipodérmica, com 150 μ L de propágulos do isolamento de 02^a de *Xap* ($OD_{540nm} = 0,4$), selecionado como resistente aos compostos antimicrobianos sintetizados pelo isolamento UFV-172 no ensaio de antibiose *in vitro*. As vagens foram mantidas em câmara úmida, a 28 °C, por uma semana. Após, por meio de uma câmera digital obtiveram-se imagens das vagens sendo essas processadas, com auxílio do software Quant (VALE et al, 2004), para a avaliação da porcentagem de área lesionada.

No segundo ensaio, as vagens foram desinfestadas como descrito anteriormente, e, posteriormente, com o auxílio de um furador de rolhas adaptado, foram realizados ferimentos nas vagens, 5 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade, em três pontos equidistantes. Sobre esses ferimentos foi depositada suspensão de propágulos do isolamento UFV-172 ($OD_{540nm} = 0,4$). As vagens foram mantidas em câmara úmida por 24 horas, a 28 °C, quando as gotas contendo propágulos dos antagonistas foram removidas com o auxílio de uma pipeta. Foram aguardados 30 minutos para que a superfície exposta ao antagonista secasse, procedendo-se a inoculação dos ferimentos com propágulos do isolamento 02A ($OD_{540nm} = 0,4$). As vagens foram incubadas por uma semana, a 28 °C, e, após, obtinham-se imagens das vagens como descrito, avaliando-se a área lesionada com o auxílio do software Quant (VALE et al, 2004). Os dois ensaios foram montados no delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições e repetidos em três épocas diferentes.

Utilização de diferentes fontes nutricionais para evidênciação de competição por nutrientes

Células do antagonista e do patógeno foram cultivadas isoladamente em meio TSA (Tryptic Soy Agar), por 48 horas, a 28 °C. Após, as células foram coletadas por meio de um cotonete esterilizado e suspensas em Fluido de Inoculação Biolog®, tendo sua concentração ajustada para 85% T, a 600 nm (BIOLOG, 2008). Aliquotas dessa suspensão foram depositadas em cavidades, em placas Biolog®, de quatro tipos diferentes: duas contendo fontes de carbono, uma contendo fontes de nitrogênio, e uma contendo fontes de fósforo e enxofre. Após 48 horas de incubação a 28 °C, foi avaliado o crescimento das bactérias em cada substrato, por meio de mudança de cor do líquido contido nas cavidades, que, em caso de haver crescimento variavam de incolor a roxo.

Resultados e Discussão

Para os isolamentos 02B, 04B, 05A, 05B, 06B,07A, 07B, 5, 5.3, 8, 9 e Xap1 de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, observou a formação de halo de inibição, evidenciando que são suscetíveis aos compostos sintetizados pelo antagonista. Os isolamentos 02A e 04B não apresentaram halo de inibição, demonstrando serem resistentes aos metabólicos do isolamento UFV-172.

Para a condução do ensaio de biocontrole em vagem, optou-se por utilizar o isolamento 02A, por ter sido mais agressivo que o isolamento 04B, em vagens, em ensaios preliminares (dados não apresentados).

Nos dois ensaios com vagens, o isolamento UFV-172 controlou o crescimento bacteriano comum, apresentando menor área lesionada ensaio 1 (Tabela 1), ensaio 2 (Tabela 2). Os resultados são indícios de que a competição por nicho possa ser um dos mecanismos envolvidos no controle. Nos ensaios, a aplicação do antagonista antes do patógeno favoreceu que este ocupasse nichos ecológicos antes de *Xap*. A colonização de raízes de tomate por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* é fortemente influenciada pela presença de *P. fluorescens*. Os dois organismos competem pela junção intercelular em raízes de tomate, uma região rica em exsudados radiculares (BOLWERK, et al., 2003). Segundo estes autores, o biocontrole de *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* por *P. fluorescens* é atribuído a competição por nicho. No controle da queima bacteriana em pereira e macieira, um isolamento de *Pantoea agglomerans* foi

capaz de colonizar rapidamente a superfície do estigma de flores das duas culturas, controlando-se assim a doença. A colonização dos estigmas das flores é vital para o sucesso da infecção de *Erwinia amylovora*, pois nesse caso, a competição por nicho está diretamente ligada ao biocontrole (VANNESTE et al, 2002). Popielarz e Neal (2007) relatam que o fato de chegar primeiro a um novo nicho, ou ser mais rápido em colonizá-lo, é vantajoso na competição. Neste trabalho, isso pode ser observado, embora não se tenha informações se *Xap* ou *B. cereus* é o organismo mais rápido na colonização do nicho ecológico. O antagonista foi dispensado primeiro, assim obteve-se a vantagem, talvez não pela velocidade de colonização, mas pela primazia.

Em trabalhos como o realizado por Bonattera et al. (2003), a competição por nicho foi comprovada pela separação do patógeno e do antagonista por meio de membranas que impediam o contato entre os microrganismos. Neste trabalho, optou-se por não utilizar tal metodologia, pois já havia sido comprovada *in vitro* a ausência de atividade antimicrobiana do antagonista contra o patógeno, em que inclusive trabalhos que utilizam essa metodologia recorrem ao ensaio de difusão em meio de cultura para confirmar sua eficiência (JANISIEWICZ et al., 2000).

No ensaio em que foram utilizadas fontes de nutrientes, observou-se que das 190 fontes de carbono testadas, 107 foram empregadas exclusivamente pelo isolamento UFV-172, uma fonte somente por *Xap*, duas por nenhuma das duas bactérias e 80 por ambas (Figuras 1 e 2). Quanto às fontes de nitrogênio, cinco foram utilizadas somente pelo antagonista, 13 somente pelo patógeno, 29 por nenhum dos microrganismos e 48 de uso comum (Figura 3). Em relação às fontes de fósforo e enxofre, 16 foram exclusivas para UFV-172, oito para *Xap*, sete para nenhuma das duas bactérias e 63 ambas utilizaram (Figura 4). Das 379 possíveis fontes nutricionais testadas, mais de 50% (191) foram de uso comum tanto do patógeno quanto do antagonista. É um resultado expressivo, que permite concluir que a competição por nutriente é um dos possíveis mecanismos envolvidos no controle de *Xap* em vagens de feijoeiro.

Em um estudo sobre a competição por nutrientes como um dos mecanismos de controle exercidos pela levedura (*Aureobasidium pullulans*) sobre *Penicillium expansum*, microplacas de Biolog® também foram utilizadas para a determinação das fontes nutricionais usadas pelo antagonista e pelo patógeno (JANISIEWICZ et al., 2000).

Além dos nutrientes de uso comum, o isolamento UFV-172 foi capaz utilizar outros 128 nutrientes, os quais *Xap* não foi capaz. A capacidade de empregar um

número maior de nutrientes favorece a colonização do antagonista em face do patógeno, uma vez que as chances de haver limitação nutricional é menor.

A capacidade de competir pelo nicho ecológico e por nutrientes é muito importante, porém não exclui a possibilidade de outros mecanismos de controle estarem sendo utilizados pelo antagonista (POPPE et al., 2003; MEZIANE et al., 2006).

Neste trabalho, observou-se o início de competição por nutrientes e por nicho ecológico como um dos possíveis mecanismos de controle envolvidos no biocontrole do cretamento bacteriano comum em vagens de feijoeiro pelo antagonista UFV-172.

Referências

- Atlas, R. M.; Bartha, R. (1998). *Microbial Ecology: Fundamentals e applications*. 4th Ed. Massachusetts. Benjamin Cummings.
- Azevedo, J. L. (1998). *Genética de microrganismos*. Goiânia. Editora Goiás.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61: 289-298.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2003) Oxidative burst elicited by *Bacillus mycooides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 1145-1153.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2004). Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control*. 30: 342-350.
- Bettiol, W. (1991). Componentes do controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. (Ed.). *Controle biológico de doenças de plantas*. pp. 01-06.
- Bolwerk, A.; Lagopodi, A. L.; Wijfjes, A. H. M.; Lamers, G E.M.; Chin-A-Woeng, T.F.C.; Lugtenberg, B. J. J.; Bloemberg, G.V. (2003). Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 11: 983-993.
- Bolwerk, A.; Lugtenberg, B. J. J. (2006) Visualization of interactions of microbial biocontrol agents and phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on tomato roots. In: Siddiqui, Z. A. (Ed.). *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. pp.217-233.

Bonaterrea, A.; Mari, M.; Casalini, L.; Montesinos, E. (2003). Biological control of *Monilinia laxa* and *Rhizopus stolonifer* in postharvest of Stone fruit by *Pantoea agglomerans* EPS125 and putative mechanisms of antagonisms. *International Journal of Food Microbiology*. 84: 93-104.

Halfeld-Vieira, B. A. H. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. 108 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Halfeld-Vieira, B. A.; Vieira Júnior, J. R.; Romeiro, R. S.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41: 1247-1252.

Hall, R. E. (1994). *Compendium of Bean Diseases*. St. Paul. APS Press.

Janisiewicz, W. J.; Toworkoski, T. J.; Sharer, C. (2000). Characterizing the mechanism of biological control of postharvest diseases on fruits with a simple method to study competition for nutrients. *Phytopathology*. 90: 1196–1200.

Kado, C. I.; Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60: 969-979.

Macagnan, D. Isolamento e seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão-parda (*Phytophthora* spp.) e estudo dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis pernicioso*. 2005. 109 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Maringoni, A. C. (1990). Controle químico do cretamento bacteriano comum do feijoeiro e seu efeito na transmissão de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye pelas sementes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 25: 1151-1156.

Meziane, H.; Gavriel, S.; Ismailov, Z.; Chet, I.; Chernin, L.; Höfte, M. (2006). Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharvest Biology and Technology*. 39: 125–133.

Paula Júnior, T. J.; Zamblim, L. (2006). Doenças. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds). *Feijão*. 2^{ed}. pp.359-414.

Poppe, L., Vanhoutte, S., Höfte, M. (2003). Mode of action of *Pantoea agglomerans* CPA-2, an antagonist of postharvest pathogens on fruits. *European Journal of Plant Pathology*. 109: 963-973.

Popielarz, P. A.; Neal, Z. P. (2007). The Niche as a theoretical tool. *Annual Review of Sociology*. 33: 65-84.

Romeiro, R. S.(2007a). *Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos*. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S. (2007b). *Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos*. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S.; Garcia, F. A. O. (2007). Residentes de filoplano como agentes de controle biológico de enfermidades de plantas. *Summa phytopathologica*. 33: 143-147.

Vale, F. X. R.; Fernandes Filho, E. R.; Liberato, J. R. (2004). QUANT - a Software for plant disease severity assessment. In: Roy E. Gaunt Memorial Workshop on Disease and Crop Loss Assessment. Christchurch.

Vieira Júnior, J. R. *Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura*. 2005. 146 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Someya, N.; Akutsu, K. (2006). Biocontrol of plant diseases by genetically modified microorganisms: Current status and future prospects. In: Siddiqui, Z. A. (Ed.). PGPR: Biocontrol and Biofertilization. pp.297-313.

Vanneste, J. L.; Cornish, D.A.; Yu, J.; Voyle, M. D. (2002). P10c: a new biological control agent for the fire blight which can be sprayed or distributed using honey bees. *Acta Horticulturae*. 590: 231-235.

Tabela 1 - Redução de área lesionada em vagens expostas ao antagonista UFV-172 e, posteriormente, inoculadas por injeção com suspensão de células do patógeno desafiante *Xap*, em três épocas diferentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey 5%.

	Tratamento	Área Lesionada	
Época 1	Água	44,6362	A
	UFV-172	20,475	B
Época 2	Água	41,2778	A
	UFV-172	18,008	B
Época 3	Água	32,4311	A
	UFV-172	17,086	B

Tabela 2 - Redução de área lesionada em vagens injuriadas e expostas ao antagonista UFV-172 e, posteriormente, inoculadas com suspensão de células do patógeno desafiante *Xap*, em três épocas diferentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem pelo teste Tukey 5%.

	Tratamento	Área Lesionada	
Época 1	Água	11,85445	A
	UFV-172	4,33555	B
Época 2	Água	14,7256	A
	UFV-172	5,3911	B
Época 3	Água	8,9833	A
	UFV-172	3,28	B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle negativo	L-Arabinose	Ac. D-Gluconico	D-Glucose	Ac. Succinico	D-Galactose	D-Fructose	L-Proline	D-Alanine	D-Treose	D-Mannose	D-Glucose
B	D-Glucose	D-Fructose	L-Fucose	Ac. D-Gluconico	D-Glucose	D,L- α -Glicerofosfato	D-Glucose	D-Glucose	Ac. Formico	D-Mannitol	D-Glucose	D-Glucose
C	D-Glucose	Ac. D,L-Malico	D-Ribose	Tween 20	D-Fructose	Ac. Acetico	α -D-Glucose	D-Glucose	D-Melibiose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
D	D-Glucose	1,2-Propanediol	Tween 40	Ac. α -Ceto glutarico	Ac. α -Ceto butirico	α -D-Lactose	α -D-Lactose	Sacarose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
E	D-Glucose	Tween 80	Ac. α -Ceto glutarico	Ac. α -Ceto butirico	Adonitol	Maltotriose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
F	Ac. Glicil-L-aspartico	M-Inositol	D-Treonina	Ac. Fumarico	Ac. Bromo succinico	Ac. Propionico	Ac. Mucico	Ac. Glicolico	D-Celobiose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
G	Ac. Glicil-L-glutamico	Ac. tricarbalico	L-Serina	L-Treonina	L-Alanina	L-Alanil-glicina	Ac. Acetoacetico	N-Acetil- β -D-manosamina	Mono metil piruvato	Metil piruvato	Ac. L-Malico	D-Glucose
H	Glicil-L-prolina	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	L-Lixose	Glucoronamida	Ac. Piruvico	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose

Uso de fontes

- Nenhuma
- UFV-172 + Xap
- Xap
- UFV-172

Figura 1 - Placa PM1 Biolog, contendo 96 diferentes fontes de carbono. Cada cavidade foi inoculada com uma suspensão de propágulos de células de *Bacillus cereus* isolamento UFV-172 ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (85% T, a 600 nm), avaliando-se o consumo das fontes pela alteração colorimétrica (Adaptado de Biolog, 2007).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle negativo	Chondroitinasulfato C	D-Glucose	D-Glucose	γ -Cidodextrina	Dextrina	Glicogênio	Inulina	Laminarina	Manan	D-Glucose	D-Glucose
B	N-Acetil-D-galactosamina	β -D-Alose	Amigdalina	D-Arabinose	Arbutin	2-Deoxi-D-Ribose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
C	Gentiobiose	Maltitol	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	Palatinose
D	Seduheptulose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
E	Ac. Caprico	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
F	Ac. Malonico	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	Ac. Oxalamico	D-Glucose	D-Glucose	D-Ribono-1,4-lactona	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	Ac. L-Tartarico
G	Acetamida	L-Alaninamida	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	L-Homoserina	Hidroxil-L-prolina	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose
H	L-Fenilalanina	D-Glucose	D-Glucose	D,L-Carnitina	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	Putrescina	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose	D-Glucose

Uso de fontes

- Nenhuma
- UFV-172 + Xap
- Xap
- UFV-172

Figura 2 - Placa PM2 Biolog, contendo 96 diferentes fontes de carbono. Cada cavidade foi inoculada com uma suspensão de propágulos de células de *Bacillus cereus* isolamento UFV-172 ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (85% T, a 600 nm), avaliando-se o consumo das fontes pela alteração colorimétrica (Adaptado de Biolog, 2007).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle negativo	Amonia	Nitrato	Nitrato	Ureia	Bioreto	L-Alanina	L-Arginina	L-Asparagina	Ac. L-Aspartico	L. Cisteina	Ac. L-Glutâmico
B	L-Glutamina	Glicina	L-Histidina	L-Isoleucina	L-Leucina	L-Lisina	L-Metionina	L-Fenilalanina	L-Prolina	L-Serina	L-Triptofano	L-Triptofano
C	L-Tirosina	L-Tirosina	D-Alanina	Ac. D-Aspartico	Ac. D-Aspartico	Ac. D-Glutâmico	D-Lisina	D-Serina	D-Valina	L-Citrulina	L-Histidina	L-Ornitina
D	Ac. N-Acetil-D.L-glutâmico	Ac. N-Acetil-D.L-glutâmico	Ac. L-Pirrolidônico	Hidroxilamina	Metilamina	N-Amilamina	N-Butilamina	Etilamina	Etilanolamina	Etilenodiamina	Peutrescina	Agmatina
E	Histamina	β -Feniletilamina	Tiramina	Acetamida	Fenilamina	Glucuronamida	D,L-Lactamida	D-Glucosamina	D-Galactosamina	D-Manosamina	N-Acetil-D-glucosamina	N-Acetil-D-Galactosamina
F	N-Acetil-D-manose	Adenina	Adenosina	Citridina	Citosina	Guanina	Gunosina	Timina	Timidina	Uracil	Uridina	Inosina
G	Xantina	Xantoxina	Ac. Úrico	Alfosana	Alantoina	Ac. Parabanico	Ac. D,L- α -Amino-N-butirico	Ac. γ -Amino-N-butirico	Ac. β -Amino-N-caproico	Ac. D,L- α -Aminocaprico	Ac. δ -Aminovalerico	Ac. α -Aminovalerico
H	Ala-Asp	Ala-Gln	Ala-Glu	Ala-Gly	Ala-His	Ala-Leu	Ala-Thr	Gly-Asn	Gly-Gln	Gly-Glu	Gly-Met	Met-Ala

Uso de fontes

- Nenhuma
- UFV-172 + Xap
- Xap
- UFV-172

Figura 3 - Placa PM3 Biolog, contendo 96 diferentes fontes de nitrogênio. Cada cavidade foi inoculada com uma suspensão de propágulos de células de *Bacillus cereus* isolamento UFV-172 ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (85% T, a 600 nm), avaliando-se o consumo das fontes pela alteração colorimétrica (Adaptado de Biolog, 2007).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controle negativo	Pirofosfato	Pirofosfato	Tetrafosfato	Tripolifosfato	Trietil fosfato	Hipofosfito	2'AMP	3'AMP	5'AMP	Adenosina-2',3' ciclica monofosfato	Adenosina-3',5' ciclica monofosfato
B	Tiofosfato	Ditiofosfato	D,L- α -Glicerol fosfato	β -Glicerol-fosfato	Carbamil-fosfato	Ac. D-2-fosfoglicérico	Ac. D-2-fosfoglicérico	2'GMP	3'GMP	5'GMP	Guanosina-2',3' ciclica monofosfato	Guanosina-3',5' ciclica monofosfato
C	1-fosfato	2-fosfato	D-Glicose-1-fosfato	D-Glicose-6-fosfato	2-Deoxi-D-glicose-6-fosfato	D-Glucosamina-6-fosfato	Ac. 6-fosfogluconico	2'CMP	3'CMP	5'CMP	Citridina-2',3' ciclica monofosfato	Citridina-2',5' ciclica monofosfato
D	3-fosfato	D-Manose-6-fosfato	Cisteina-S-fosfato	3-fosfato	O-Fosfo-D-serina	O-Fosfo-L-serina	O-Fosfo-L-treonina	3'UMP	3'UMP	5'UMP	Uridina-2',3' ciclica monofosfato	Uridina-3',5' ciclica monofosfato
E	4-fosfato	O-Fosfo-L-tirosina	Fosfocreatina	Fosfoetilcolina	O-Fosfoetil etanoalmina	Ac. Fosfona Acético	Ac. 2-Aminoetil fosfonico	Ac. Metileno difosfonico	3'TMP	5'TMP	Inositol hexafosfato	Timidina-3',5' ciclica monofosfato
F	Controle negativo	Tiosulfato	Tiosulfato	Tiofosfato	Tiofosfato	Ditiofosfato	L-Cisteina	L-Cisteinilglicina	L-Cisteinilglicina	Ac. L-Cisteico		
G	N-Acetil-L-cisteina	S-Metil-L-cisteina	Cistationina	Lantionina	Glutationa	L-Metionina	L-Metionina	D-Metionina	Glicil-L-metionina	N-Acetil-D,L-metionina	L-Metionina sulfóxida	L-metionina sulfona
H	Ac. L-Djenkólico	Tiourea	L-Tio- β -D-glicose	D,L-Lipoamida	Taurina	Taurina	Hipotaurina	Ac. p-Amino benzeno sulfônico	Ac. Butano sulfônico	Ac. 2-Hidroxi metano sulfônico	Ac. Metano sulfônico	Tetrametileno sulfona

Uso de fontes

- Nenhuma
- UFV-172 + Xap
- Xap
- UFV-172

Figura 4 - Placa PM4 Biolog, contendo diferentes fontes de fósforo e enxofre. Cada cavidade foi inoculada com uma suspensão de propágulos de células de *Bacillus cereus* isolamento UFV-172 ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (85% T, a 600 nm), avaliando-se o consumo das fontes pela alteração colorimétrica (Adaptado de Biolog, 2007).

CAPÍTULO 7

Tendência Populacional de Agentes de Biocontrole Dispensados no Filoplano de Plantas de Feijoeiro

Resumo

O monitoramento de populações de bactérias no filoplano é tarefa difícil, principalmente pela diversificada microbiota que o compõe. Porém, é importante conhecer o comportamento de um agente de biocontrole após sua dispensa no filoplano. Neste trabalho, estudou-se a tendência populacional de bactérias residentes de filoplano agentes de biocontrole de doenças após sua dispensa. Três agentes de biocontrole, dois isolamentos de *Bacillus cereus*, mutantes resistentes à penicilina e estreptomicina (UFV-172 e UFV075) e um isolamento de *Pseudomonas putida* (UFV-Pp), foram dispensados por atomização no filoplano de plantas de feijoeiro cultivadas em casa de vegetação. Folhas da planta foram coletadas e procedeu-se à extração dos antagonistas em solução salina (0,85%), sendo o lavado obtido diluído serialmente e feita a semeadura em placa de Petri com meio semi-seletivo, para os antagonistas. Nenhum dos antagonistas testados foi capaz de colonizar o filoplano de plantas de feijoeiro eficientemente. A população dos mutantes de *B. cereus* só foi quantificada até 12 horas após a sua dispensa no filoplano. Já o isolamento de UFV-Pp foi capaz de estabelecer-se por um período maior, porém com acentuada queda populacional, em razão do tempo.

Populational tendencies of biocontrol agents when delivered to bean phylloplane

Abstract

To monitor bacterial populational tendencies in the phylloplane is a hard task mainly due to the complex microbiota usually present at plant surfaces. Nevertheless, it is rather important to know the behavior of an agent of biological control after its deliver to plant surfaces. In this work, populational tendencies of prokaryotic phylloplane residents (*Bacillus cereus*, isolates UFV-172 e UFV075 and *Pseudomonas putida*, isolate UFV-Pp) previously selected as biocontrol agents, was monitored in bean phylloplane. The organisms were delivered to bean plants kept in a greenhouse by spraying and, after intervals, leaves were harvested and transferred to saline (0,85% NaCl). Washes were serially diluted and plated on semi-selective medium developed for this purpose. Results indicate that no antagonist was able to colonize bean phylloplane in an efficient way and populations of *B. cereus* were tracked only up to 12 hours. On the other hand, populations of isolate UFV-Pp was able to be tracked for a longer time in spite of the fact that it quickly decreased as a function of time.

Introdução

O uso de bactérias residentes de filoplano no controle biológico de doenças de planta tem sido estudado nos últimos anos (ROMEIRO; GARCIA, 2007). Porém, ainda existem muitas questões envolvidas na interação entre a planta e o residente de filoplano que necessitam ser elucidadas. Problemas relacionados à sobrevivência do antagonista no filoplano, à dinâmica de sua população nesse *habitat*, são pontos cruciais para o avanço da pesquisa e da utilização futura desses agentes de biocontrole.

O monitoramento da população de bactérias no filoplano não é uma tarefa fácil, uma vez que o filoplano não é um meio estéril, é altamente mutável e com enorme variação populacional (KINKEL, 1997), e é difícil o uso de modelos que possam explicar a dinâmica populacional (KINKEL et al., 2002).

Vários métodos são utilizados para o estudo da dinâmica populacional de procariontes no filoplano, como o uso de ferramentas moleculares (BULL et al., 1991; BLOEMBERG et al., 1997), microscopia eletrônica (LINDOW; BRANDL, 2003; MONIER; LINDOW, 2004), mutantes resistentes a antibióticos (THEODORO; MARINGONI, 2002; LINDOW; SUSLOW, 2003) e meios de cultura semi-seletivo (GERHARDT et al., 1994) dentre outros. O uso de antibióticos constitui-se em medida simples e barata para o estudo da dinâmica populacional. Porém, o uso de mutantes deve ser utilizado com certo cuidado, uma vez que há evidências de que essa mutação pode afetar a dinâmica da população (SCHROTH, 1992). Entretanto, é possível a utilização de antibióticos sem recorrer à busca por mutantes resistentes. Moura e Romeiro (1998) propõem que a resistência múltipla constitutiva, uma característica natural de populações bacterianas, possa ser utilizada para o estudo de microrganismos com antibióticos sem o emprego de isolamentos mutantes. A resistência múltipla constitutiva a antibióticos pode ser conceituada como a resistência natural de dada população e, ou espécie bacteriana a vários antibióticos diferentes ao mesmo tempo (ROMEIRO, 2005). O objetivo dessa técnica é identificar qual grupo de antibióticos ao qual a população e, ou, espécie estudada é resistente e, a partir daí, incorporar esses antibióticos a um meio de cultura, tendo-se então um meio semi-seletivo que, em condições ideais, não restrinja o microrganismo-alvo do estudo, mas que seja supressivo aos demais.

Objetivou-se, neste trabalho, estudar a dinâmica populacional de três isolamentos bacterianos residentes de filoplano, na superfície de folhas de plantas de

feijão cultivadas em condição de casa de vegetação, utilizando mutantes resistentes a antibióticos e a resistência múltipla constitutiva.

Material e Métodos

Antagonistas, sua origem e cultivo

Os antagonistas utilizados pertencem à coleção do Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Controle Biológico da UFV. Os isolamentos de *Bacillus cereus* UFV-172 e UFV-075 (VIEIRA JÚNIOR, 2005) foram isolados de filoplano de feijoeiro e selecionados como agentes de biocontrole de doenças da cultura e o isolamentos de *Pseudomonas putida* UFV-Pp isolado de filoplano de tomateiro (HALFELD-VIEIRA, 2002) e selecionado como agente de biocontrole de doenças da cultura. Os antagonistas foram cultivados, no meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), e posteriormente preservados por repicagem tubo-a-tubo e sob óleo mineral (ROMEIRO, 2007).

Antibiograma para determinação de resistência múltipla constitutiva a antibióticos.

Os antagonistas UFV-172 e UFV-075 foram cultivados em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), líquido, a 28 °C por 24 horas. Após, foram coletados 100 µL do crescimento bacteriano incorporadas ao meio 523 (KADO; HESKETT, 1970), sólido, em estado fundente (aproximadamente 48 °C), vertendo-o em placas de Petri. Após a solidificação do meio, foram depositados em sua superfície discos de antibióticos. Utilizaram-se 52 diferentes tipos de antibiótico. A resistência aos antibióticos foi avaliada pela constatação da presença do halo de inibição.

Proposição de meio semi-seletivo para estudo da dinâmica populacional de dois isolamentos de *B. cereus*

O antibiograma permitiu selecionar três antibióticos, aos quais os dois isolamentos de *B. cereus* são resistentes, bacitracina: oxacilina e trimetoprima. Para a determinação das concentrações de cada antibiótico a ser utilizado, estudou-se o efeito da repressividade destes às bactérias em meio 523 (KADO; HESKETT, 1970) líquido,

acrescido dos antibióticos em quatro concentrações (0, 100, 150 e 200 µg/mL). Para tanto, 100 µL de propágulos dos antagonistas na fase exponencial de crescimento, cultivados meio 523, líquido, foram depositados em frascos tipo “side arm flask”, contendo meio 523, líquido e os antibióticos nas concentrações descritas. Os frascos foram mantidos a 28 °C sob agitação e, em intervalos regulares de 2 horas, fez-se a leitura do crescimento bacteriano por meio de espectrofotometria em densidade óptica de 540 nm. Após a determinação das concentrações dos antibióticos a serem utilizadas, estudou-se a capacidade do meio semi-seletivo idealizado (meio 523 acrescido dos antibióticos), em suprimir a microbiota do filoplano de feijoeiro. Folhas de feijoeiro, coletadas de plantas cultivadas em área experimental da UFV, foram transferidas para erlenmeyers contendo solução salina (0,85%), na proporção 1g de folha/100 mL de solução extratora. Foi feita a extração em banho de ultra-som, por 25 minutos (HALFELD-VIEIRA, 2002) e retirou-se uma alíquota de 100 µL, que foi repicada para placa de Petri com meio 523 contendo os antibióticos. Como controle, utilizou-se o meio 523 sem antibiótico.

Seleção de mutantes para o estudo de dinâmica populacional

Um ensaio para a seleção de mutantes dos isolamentos UFV-172 e UFV-075, resistentes a sulfato de estreptomicina e penicilina G, foi conduzido utilizando-se a técnica de gradiente conforme Azevedo (1998). Para tanto, placas de Petri foram inclinadas a aproximadamente 40° e, sobre elas, vertido ágar-água (2%). Aguardou-se a solidificação e, sobre essa primeira camada, verteu-se uma segunda camada de meio 523 semi-sólido, no estado fundente, ao qual foi incorporada suspensão de sulfato de estreptomicina e penicilinaG, de forma a se obter concentração final de 100 µL/mL de cada antibiótico e aguardou sua solidificação. Dessa maneira, obteve-se um gradiente de antibiótico no meio indo de 0 a 100 µL /mL. Posteriormente, 100 µL de propágulos dos antagonistas na fase exponencial de crescimento, em meio 523 líquido foram depositados sobre a superfície das placas e espalhados com o auxílio de alça de Drygalski. As placas foram incubadas a 28 °C, por 48 horas. Colônias que surgiram na parte mais concentrada do meio foram repicadas para placas de Petri contendo meio 523 acrescido dos dois antibióticos a 100 µL /mL. Com esse meio semi-seletivo testou-se a capacidade de suprimir a microbiota do filoplano de feijoeiro, conforme feito no ensaio

anterior. Para estudo da dinâmica populacional de *P. putida*, utilizou-se meio semi-seletivo, proposto por Ferraz et al. (2007).

Monitoramento da tendência populacional de três agentes de biocontrole residentes de filoplano em casa de vegetação.

Plantas de feijão cultivadas em casa de vegetação, no estágio V4 da escala proposta por Fernández et al. (1985) citados por Santos e Gavilanes (2006), foram atomizadas com suspensão de propágulos dos antagonistas ($OD_{540} = 0,4$). Uma folha de plantas atomizadas com os antagonistas foi coletada a intervalos de tempo de: 0 horas, 12 horas (0,5 dia), 24 horas (1 dias), 48 horas (2 dias) e 120 horas (5 dias) após a dispensa. A folha foi pesada e transferida para um erlenmeyer com 100 mL de solução salina (0,85%) esterilizada, contendo Tween 80 (0,05%), e colocada em banho de ultrassom por 25 minutos para a extração do antagonista de sua superfície. Obtido o lavado, foi feita sua diluição seriada em tubos de ensaio contendo solução salina (0,85%) esterilizada. As diluições foram semeadas em meio semi-seletivo para cada um dos isolamentos (meio semi-sólido + antibióticos) e, posteriormente, incubando-se as placas a 28 °C, por 24 h, quando foi avaliado o número de ufc.g⁻¹ de tecido.

Resultados e Discussão

Conforme os resultados dos antibiogramas qualitativos, os dois isolamentos de *B. cereus* não foram inibidos por três antibióticos: bacitracina, oxacilina e trimetoprima. Selecionaram-se esses antibióticos para os ensaios de repressividade e supressividade. Nos ensaios de repressividade, não foi observado efeito negativo desses nas concentrações utilizadas sobre a curva de crescimento bacteriana (Figura 1). Porém, o meio não foi supressivo para a microbiota do filoplano de feijoeiro (dados não apresentados).

Como o meio semi-seletivo idealizado, com base na resistência múltipla constitutiva, não se prestou para o estudo da dinâmica populacional, optou-se portanto pela seleção de mutantes resistentes a dois antibióticos: estreptomicina e penicilina, que possuem amplo espectro e modo de ação diferente. O meio semi-seletivo com esses dois antibióticos demonstrou ser supressivo, não se observando crescimento de nenhum microrganismo sobre sua superfície.

No ensaio de monitoramento populacional no filoplano, a população de *P. putida*, isolamento UFV-Pp, manteve-se estável por 12 horas após a sua dispensa. Transcorrido esse período, observou-se o declínio populacional, que caiu da ordem de 10^7 ufc/g de folha, no tempo zero, para 10^3 ufc/g de folha, no quinto dia (Figura 2).

A população dos isolamentos mutantes de UFV-172 e UFV-075 comportou-se de forma não esperada. Na avaliação feita 12 horas após a dispensa observou-se que a população havia aumentado de cerca 10^7 ufc/g de folha para 10^8 ufc/g de folha. Porém, após mais 12 horas, na avaliação de um dia após a dispensa e nas demais avaliações, não foi observada nenhuma colônia na superfície do meio semi-seletivo (Figuras 3 e 4). O resultado indica que as bactérias ou não estavam presentes no filoplano ou não mais se multiplicaram no meio.

A queda da população de *P. putida* pode ser explicada em parte pelo fato de a bactéria ser autóctone do filoplano de tomateiro (HALFELD-VIEIRA, 2002), podendo assim não possuir aptidão para colonizar esse novo *habitat*. Há também que se ponderar sobre a metodologia utilizada, uma vez que estando no filoplano, as células bacterianas buscam nichos que as protejam das intempéries ambientais e forneçam nutrientes (BEATTIE; LINDOW, 1999; LINDOW E BRANDL, 2003). O uso de ultra-som pode não se constituir uma alternativa eficaz para a remoção de células bacterianas desses nichos protegidos (HIRANO; UPPER, 2000). O'Brien e Lindow (1989), estudando populações de *P. syrnigae*, observaram que tanto a extração com sonificador quanto a utilização de meio semi-seletivo com antibióticos, possuíam baixa eficiência na recuperação de células microbianas. Assim, o resultado observado pode indicar que está ocorrendo o declínio da população, mas não pode-se afirmar que isso realmente aconteceu.

Com relação à brusca queda das populações dos isolamentos UFV-172 e UFV-075, possivelmente tenham perdido a capacidade de crescer no meio com o antibiótico. Snyder e Champness (2003), postulam que geralmente a resistência a antibióticos está condicionada a genes encontrados em plasmídeos e que não é fato raro a cura desses plasmídeos, levando a perda da resistência a antibióticos. É possível que isso possa ter ocorrido no presente estudo. Outro fato é que quando se trata da dinâmica populacional no filoplano, não se pode deixar de lado o fato que residentes de filoplano colonizam quase sempre nichos protegidos e também podem colonizar o interior dos tecidos, como se fossem endofitas (Kinkel, 1997; Beattie e Lindow, 1999; Lindow e Brandl, 2003). Assim, como observado por Stadt e Saettler (1981) a eficiência de recuperação de

bactérias dispensadas no filoplano em meio seletivos com antibióticos pode variar de 1 a 35% de eficiência.

Referências

- Azevedo, J. L. (1998). Genética de microrganismos. Goiânia. Editora Goiás.
- Beattie, G. A.; Lindow, S. E. (1999). Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*. 89:353-359.
- Bloemberg, V. G.; O'toole, G. A.; Lugtenberg, B.J. J.; Kolter, R. (1997). Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4543–4551.
- Bull, C. T.; Weller, D. M.; Thomashow, L. S. (1991). Relationships between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*. 81: 954–959.
- Ferraz, H. G. M.; Barra, V. R.; Barbosa, A. M. C.; Garcia, F. A. O.; Freitas, M. A.; Lanna Filho, R.; Romeiro, R. S.; Bonon, K.; Halfeld-Vieira, B. A. (2007). Desenvolvimento e teste de um meio seletivo para o agente de biocontrole *Pseudomonas putida* com base na resistência múltipla constitutiva a antibióticos. *Summa Phytopathologica*. 33:18. (resumo).
- Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W. A.; Krieg, N. R. (1994). *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington. ASM.
- Halfeld-Vieira, B. A. H. Bactérias residentes do filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura. 2002. 108 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.
- Hirano, S. S.; Upper, C. D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 624-653.
- Kado, C. I.; Heskett, M. G. (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*. 60: 969-979.

Kinkel, L. L. (1997). Microbial population dynamics on leaves. *Annual Review of Phytopathology*. 35: 327-347.

Kinkel, L. L.; Newton, M. R.; Leonard, K. J. (2002). Resource aggregation in the phyllosphere: implications for microbial dynamics across spatial scales. In: Lindow, S. E.; Hecht-Poinar, E. I.; Elliot, V.J. (Eds.). *Phyllosphere microbiology*. pp.317-340.

Lindow, S. E.; Brandl, M. T. (2003). Microbiology of the Phyllosphere. *Applied Environmental Microbiolog.* 69: 1875-1883.

Lindow, S.E.; Suslow, T.V. (2003). Temporal dynamics of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* strain A506 in flowers in inoculated pear trees. *Phytopathology*. 93: 727-737.

Monier, J. M.; Lindow, S. E. (2004). Frequency, size, and localization of bacterial aggregates on bean leaf surfaces. *Applied And Environmental Microbiology*.70:346–355.

Moura, A. B.; Romeiro, R. S. (1998). Um meio seletivo para *Ralstonia solanacearum* baseado em resistência múltipla natural a antibióticos. *Fitopatologia Brasileira*. 23: 466-470.

O'Brien, R. D.; Lindow, S. E. (1989). Effect of plant species and environmental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria. *Phytopathology*. 79:619-627.

Romeiro, R. S. (2005). *Bactérias Fitopatogênicas*. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S. (2007). *Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos*. Viçosa. Editora UFV.

Romeiro, R. S.; Garcia, F. A. O. (2007). Residentes de filoplano como agentes de controle biológico de enfermidades de plantas. *Summa phytopathologica*. 33: 143-147.

Santos, J. B.; Gavilanes, M. L. Botânica. In: Vieira, C.; Paula Júnior, T. J.; Borém, A. (Eds). Feijão. 2^{ed}. 2006. pp.41-66.

Schroth, M. N. (1992). Risks of releasing wild-type and genetically engineered biocontrol organisms into the ecosystem. In: Tjamos, E. S.; Papavizas, G. C.; Cook, R.J. (Eds.). Biological control of plant diseases. New York. Plenum Press. pp.371-379.

Snyderof, L.; Champness, W. (2003). Molecular genetics of bacteria. Washington. ASM Press.

Stadt, S. J.; Saettler, A. W. (1981). Effect of host genotype on multiplication of *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathology*. 71:1307-1310.

Theodoro, G. D.; Maringoni, A. C. (2002). Survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in "manipueira" under environmental conditions. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. 37: 945-953.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

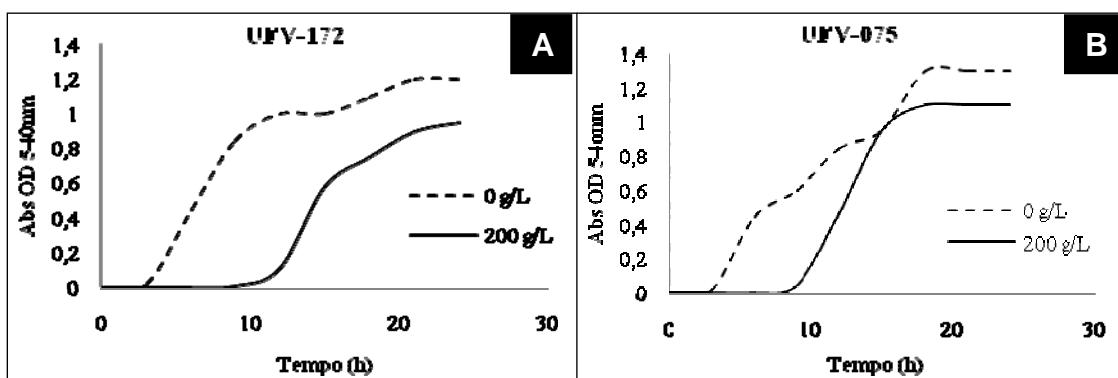


Figura 1 – Efeito de repressividade dos antibióticos estreptomicina e penicilina no crescimento bacteriano de mutantes *Bacillus cereus* resistentes aos antibióticos. A) Mutante do isolamento UFV-172. B) Mutante do isolamento UFV-075. ----- =ntibióticos Meio 523 não acrescido dos antibóticos penicilina e estreptomicina; _____ = Meio 523 acrescido dos antibóticos penicilina e estreptomicina.

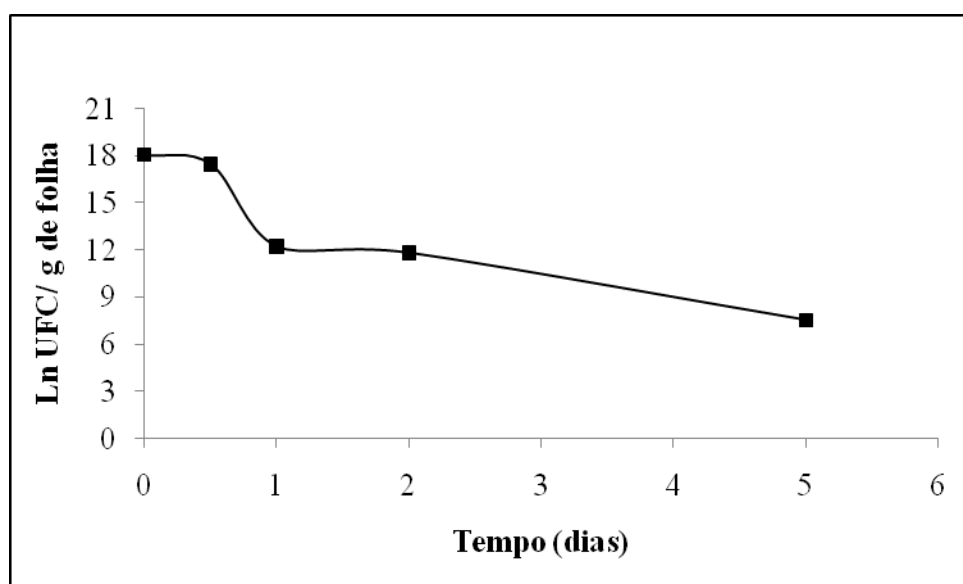


Figura 2- Tendência populacional do isolamento de *Pseudomonas putida*, quando dispensados no filoplano de feijoeiro.

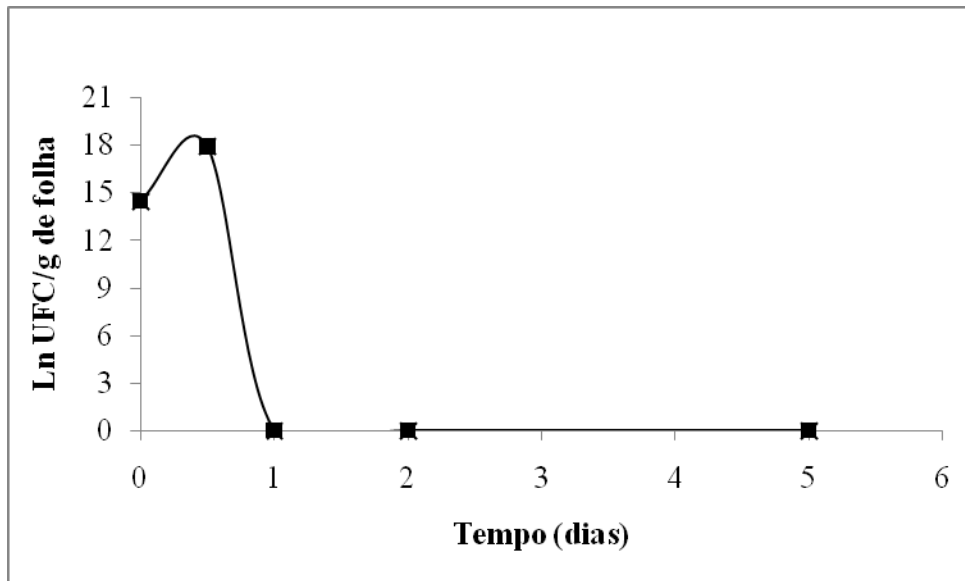


Figura 3- Tendência populacional do mutante de UFV-172, quando dispensado no filoplano de feijoeiro.

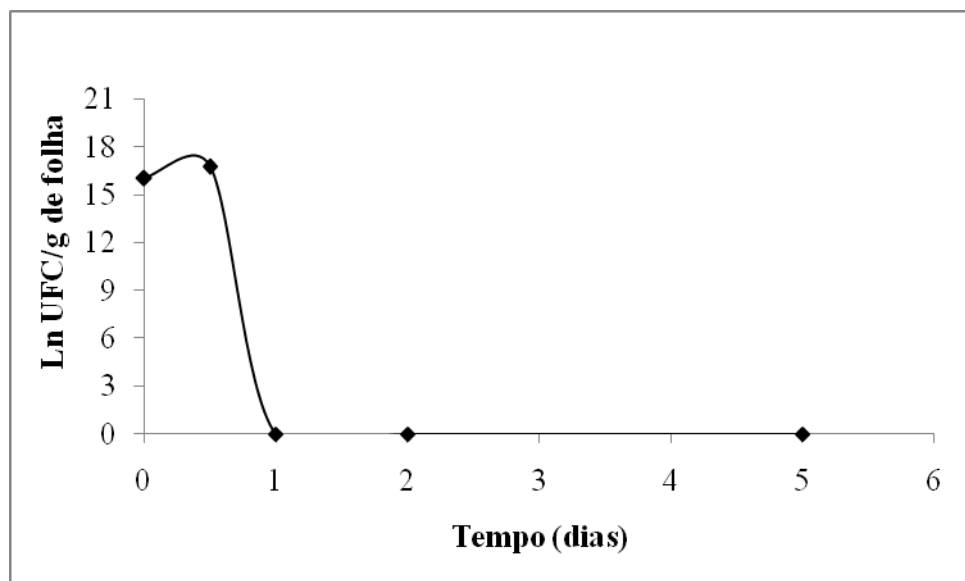


Figura 4- Tendência populacional do mutante de UFV-075, quando dispensado no filoplano de feijoeiro.

CAPÍTULO 8

Indução de Síntese de Gliceolina como Resposta de Cotilédones de Soja à Exposição a Células Viáveis, Extratos e Metabólitos de um Isolamento de *Bacillus cereus*, agente de Biocontrole de Doenças do Feijoeiro

Resumo

Poucos são os relatos sobre residentes de filoplano como indutores de resistência em plantas a patógenos. Os métodos utilizados para a evidenciação da indução de resistência são muitas vezes complexos e dispendiosos. Há então a necessidade de se buscar métodos alternativos para o estudo da eliciação de resistência em plantas tanto por agentes bióticos como por abióticos. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a síntese da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja, expostos a propágulos dos antagonistas UFV-172 e UFV-075, bem como a seus metabólitos e frações de células rompidas (extrato) e a um ativador químico, Acibenzolar-S-metil (ASM). Para tanto, cotilédones de soja foram seccionados longitudinalmente na sua face superior e expostos aos eliciadores em meio líquido. Fez-se a leitura em espectrofotômetro a 285 nm da atividade de gliceolina, nos tempos 0 e 24 horas após a exposição, calculando-se a variação das leituras nos dois tempos. O ensaio foi montado no DIC, com duas repetições espaço e duas no tempo. Foi observada a síntese de gliceolina em cotilédones expostos aos antagonistas e a seus metabólitos e extratos de células. Pode-se concluir que o teste pode ser utilizado como ferramenta para evidenciar a indução de resistência em plantas, bem como para selecionar os de residentes de filoplano com potencialidades para a indução de resistência.

Induction of glyceollin synthesis as a response of soybean cotyledons to exposure to viable cells, extracts and metabolites from an isolate of *Bacillus cereus*, a biocontrol agent for bean diseases

Abstract

Reports on prokaryotic phylloplane residents as inducers of resistance in plants to pathogens are uncommon while methods to detect the induced state are usually complex and expensive. It goes without saying that there is a need for simpler methods for studying induction of resistance by elicitors either biotic or abiotic. In this work the response of soybean cotyledons in terms of glyceollin synthesis was used to detect the ability of live propagules, metabolites and cell extracts belonging to isolates UFV-172 e UFV-075 of *Bacillus cereus* to induce resistance. The chemical activator ASM (acyl-benzolar-S-methyl) was also used as an additional control. Soybean (IAC 18) cotyledons were cut lengthwisely in their upper surface and exposed to elicitors by dipping for 24 hours. At a spectrophotometer, in order to quantify glyceollin, absorbance readings were taken at 285nm, after 0 and 24 hours. The assay was set in a completely randomized model, with replicates, being twice in time and twice in space. The synthesis of the phytoalexin glyceollin was detected in the case of soybean cotyledons exposed to all treatments. The method might turn into an auxiliary procedure in order to select prokaryotes potentially inducers of resistance in plants.

Introdução

A indução de resistência em plantas a patógenos, seja pela ação de ativadores bióticos ou abióticos (WALLING, 2001; BOUNARIO et al., 2002; PRATS et al., 2002), é um dos mecanismos de controle de doenças mais estudados ultimamente. Rizobactérias são os organismos mais estudados (VAN LOON et al., 1998) como eliciadores de resistência em plantas. São raros e recentes os relatos de residentes de filoplano induzindo resistência em plantas (BARGABUS et al., 2002; 2003; 2004; HALFELD-VIEIRA, 2006).

Ao verificar a elevação de uma planta ao chamado "estado de indução", não há uma regra clara a ser seguida para a sua comprovação. Steiner e Schönbeck (1995) propuseram sete critérios para a evidênciação do chamado estado de indução: 1) ausência de efeito de tóxico do agente indutor sobre o patógeno; 2) supressão da resistência induzida pela exposição prévia da planta a substâncias que inibem a expressão de genes do hospedeiro; 3) necessidade de um intervalo de tempo entre a exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência; 4) não haver uma relação entre a magnitude da resistência expressa e quantidades crescentes do indutor aplicado; 5) inespecificidade da proteção, 6) a resistência ser local e sistêmica; e 7) a resistência ser dependente do genótipo da planta.

Porém, existem outros critérios que auxiliam na determinação da indução de resistência como mecanismo de controle de um fitopatógeno, dentre os quais a quantificação da atividade de enzimas específicas indicadoras do estado de indução, envolvidas na defesa (CHEN et al., 2000), mas nem sempre é fácil a comprovação desses critérios. Mesmo as metodologias tradicionais, como as usadas na determinação da atividade de enzimas indicadoras do estado de indução, são técnicas complexas, dispendiosas e demoradas.

Contudo, há outras formas de se detectar a habilidade de determinado microrganismo de atuar como indutor de resistência. Por exemplo, a capacidade de plantas em restringir a multiplicação de patógenos em seus tecidos pode ser entendida como uma ação de resistência, seja constitutiva, seja induzida.

Vieira Júnior (2005) observou que plantas de feijoeiro que tiveram seu filoplano exposto ao agente de biocontrole UFV-172 (*Bacillus cereus*) foram capazes de impedir a multiplicação de células do patógeno desafiante *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* no interior dos tecidos de folhas. Os resultados encontrados pelo autor

assemelham-se ao que foi postulado por Sticher et al. (1997). Esses autores afirmam que plantas que têm seus mecanismos de resistência eliciados são capazes de restringir o desenvolvimento de células do patógeno em seu interior.

Fitoalexinas são compostos antimicrobianos, de baixo peso molecular, sintetizados por plantas após a exposição dos tecidos a um agente indutor, que pode ser químico ou biótico (AGRIOS, 2005). Em geral, as fitoalexinas causam a morte do microrganismo exposto a elas. Sabe-se que em fungos, atuam sobre membranas, inibindo os compostos enzimáticos, o que leva a morte do fungo (LO et al., 1996). De uma forma ou de outra, fitoalexinas são consideradas respostas de resistência de plantas.

Há vários composplantatos químicos isolados e caracterizados como fitoalexinas, cumarina, flavonóides, diterpenos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Em soja, uma das fitoalexinas sintetizadas com maior intensidade é a gliceolina ($C_{21}H_{22}O_5$) (INGHAM, 1982), um isoflavonóide, com importante papel na interação soja-patógeno (GUZZO; MORAES, 1997). A síntese de gliceolina por plantas de soja depende da existência de algum estresse, como a invasão de seus tecidos por um fitopatógeno. Assim, admite-se que a sua síntese está envolvida no mecanismo de resistência induzida de plantas (CAVALCANTI et al., 2006). Dessa forma, a detecção de gliceolina em tecidos sadios pode ser uma evidência de que a planta foi elevada ao estado de indução. Há vários trabalhos utilizando o ensaio com cotilédones de soja (KEEN; ROMEIRO, 1982; BOUÉ et al., 2000; BONALDO et al. 2004). Essa metodologia foi desenvolvida por Albershen e Valent (1978), como método para a determinação do potencial de substâncias como eliciadoras de resistência.

Neste trabalho, objetivou-se avaliar a síntese de gliceolina por cotilédones de soja expostos a dois isolamentos de *Bacillus cereus* (células viáveis, extratos e metabólitos), a ser utilizada como um possível teste de indicação do estado de indução e da capacidade eliciadora dos agentes testados.

Material e Métodos

Tratamentos e seu preparo

Os tratamentos utilizados foram: 1) propágulos dos isolamentos de *B. cereus* UFV-172 e UFV-075, cultivados em meio nutriente ágar (Difco), por 24 horas, a 28 °C, ressuspensos em água e com concentração ajustada para $OD_{540nm} = 0,4$; 2)

sobrenadante dos antagonistas, que foi obtido a partir de suspensão de células do antagonistas preparados como no tratamento 1. Após, centrifugou-se a 10.000 g/10 minutos, coletou-se o sobrenadante, onde se presumia estarem os metabólitos bacterianos; 3) células dos antagonistas rompidas. As frações de células eram obtidas a partir do precipitado resultante da centrifugação realizada para o tratamento 2. O precipitado foi ressuspensionado em 35 mL de água destilada, acrescentado sílica gel 2% (p/v) e congelados a -80 °C por, 5 minutos. Após, colocou-se em almofariz e foi macerado com pistilo, para rompimento das células. Esse ciclo de congelamento e maceração foi realizado cinco vezes. Após o último ciclo, o extrato de célula rompida foi centrifugado a 10.000 g/10 minutos, coletando-se o sobrenadante, onde se presumia estar o extrato de células; 4) acibenzolar-S-metil (ASM), foi preparado na concentração 150 µg.mL⁻¹; 5) controle, utilizando-se água.

Ensaio com cotilédones de soja

Foi utilizado o ensaio com cotilédones de soja proposto por Albershen e Valent (1978), com modificações. Sementes de soja cultivar IAC-18 foram plantadas em vasos contendo substrato (2:2:0,5; areia:argila:esterco) e, aos 10 dias após a emergência, coletavam-se os cotilédones, que eram seccionados na sua face superior, longitudinalmente, e colocados em placas de Petri. A essas placas adicionaram-se de 1 mL de norflaxacin e 1 mL de lincomicina, ambas com concentração final de 200 µg.mL⁻¹, e 5 mL das soluções e suspensões que constituíam os tratamentos. As placas foram incubadas a 25 °C por 24 horas, com fotoperíodo de 12 horas. A gliceolina foi quantificada por meio de leitura em espectrofotômetro (HITACHI-U3000), OD 285 nm, nos tempos 0 e 24 horas, após a exposição dos agentes eliciadores. O ensaio foi montado no delineamento inteiramente casualizado e implementado com duas repetições e repetido duas vezes no tempo.

Resultados e Discussão

Os antagonistas, seus extratos e metabólitos foram capazes de induzir a síntese de gliceolina em relação ao controle, nos dois ensaios realizados, mas não o ativador químico ASM (Figuras 1 e 2). É possível que o tempo entre a exposição dos cotilédones ao eliciador e a leitura final não tenha sido suficiente para que o processo de indução se

completasse. Bonaldo et al. (2004) observaram a eliciação de gliceolina em cotilédones de soja por ASM, porém notou-se um intervalo de 60 horas entre a exposição dos cotilédones ao eliciador e a avaliação. Outro fato a ser observado, é que foram usados cultivares diferentes, mas neste trabalho utilizou-se IAC-18 e, no trabalho citado, o IAC-8. Em verdade, um dos critérios propostos por Steiner e Schönbeck (1995) é ser a indução dependente do genótipo da planta. Assim, um composto pode ser eliciador em uma espécie ou cultivar de planta e não ser em outra. Liu et al. (1995) observaram que duas rizobactérias foram capazes de eliciar a resistência em três cultivares de pepino de um total de quatro testadas.

Os sobrenadantes obtidos das células dos dois antagonistas induziram a síntese de gliceolina (Figuras 1 e 2). Nesse sobrenadante, espera-se encontrar metabólitos sintetizados e secretados pela bactéria e algumas proteínas como pilina, envolvidas no reconhecimento planta-bactéria (WEBER; KOEBNIK, 2006) e que são capazes de induzir reação de hipersensibilidae, onde se observa também a síntese de fitoalexinas (AGRIOS, 2005).

O tratamento com extratos de frações de célula rompidas também foi capaz de induzir a síntese de gliceolina, nos cotilédones (Figuras 1 e 2). Nesses extratos, possivelmente existem fragmentos de paredes celulares, de membranas, moléculas grandes como exopolissacarídeos (EPS), que poderiam atuar como indutores de resistência. A evidenciação de macromoléculas como indutoras de resistência foi observada por Romeiro et al. (2005), utilizando-se moléculas de um isolamento de *B. cereus* em plantas de tomate.

Foi mostrado, neste trabalho, que a avaliação da indução da fitoalexina gliceolina em cotilédones de soja pode ser importante ferramenta na evidenciação da eliciação de resistência induzida em plantas por bactérias antagonistas.

Referências

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 6 ed. San Diego. Academic Press.
- Albershen, P.; Valent, B. S. (1978). Host-pathogen interactions in plants. *The Journal of Cell Biology*. 78: 627-643.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2002). Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 61: 289-298.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2003). Oxidative burst elicited by *Bacillus mycooides* isolate Bac J, a biological control agent, occurs independently of hypersensitive cell death in sugar beet. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 16: 1145-1153.
- Bargabus, R. L.; Zidack, N. K.; Sherwood, J. E.; Jacobsen, B. J. (2004). Screening for the identification of potential biological control agents that induce systemic acquired resistance in sugar beet. *Biological Control*. 30: 342-350.
- Bonaldo, S. M.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Stangarlin, J. R.; Tessmann, D. J.; Scapim, C. A. (2004). Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. *Fitopatologia Brasileira*. 29:128-134.
- Boué, S. M.; Carter, C. H.; Ehrlich, K. C.; Cleveland, T. E. (2002). Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. 48: 2167 -2172.
- Bouario, R.; Scarponi, L.; Ferrara, M.; Sidoti, P.; Bertona, (2002). A. Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. *European Journal of Plant Pathology*. 108: 41-49.

Cavalcanti, L. S.; Brunelli, K. R.; Stangarlin, J. R. (2006). Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: Cavalcanti, L. S.; Di Piero, R. M.; Cia, P.; Pascholati, S. F.; Resende, M. L. V.; Romeiro, R. S. (Eds). Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos. pp.81-123.

Chen, C.; Bélanger, R. R.; Benhamou, N.; Paulitz, T. C. (2002). 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.

Guzzo, S. D.; Moraes W. B. C. (1997). Purificação e caracterização de parcial de um elicitor de fitoalexina em soja, a partir de uredíniosporos de *Hemileia vastatrix*. *Fitopatologia Brasileira*. 22: 396-402.

Halfeld-Vieira, B. A.; Vieira Júnior, J. R.; Romeiro, R. S.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C. (2006). Induction of systemic resistance in tomato by the autochthonous phylloplane resident *Bacillus cereus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 41: 1247-1252.

Ingham, J. L. (1982). Phytoalexins from the Leguminosae. In: Biley, J. A.; Mansfield, J. W. (Eds.). *Phytoalexins*. pp. 21-80.

Keen, N. T.; Romeiro, R. S. (1982). Produção de gliceolina por cotilédones de soja expostos a eliciadores obtidos de diferentes isolamentos de fitobactérias. *Fitopatologia Brasileira*. 7: 559. (resumo).

Liu, L.; Kloepper, J. W.; Tuzun, S. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 85: 843-847.

Lo, L. C.; Weiergang, I.; Bonham, C.; Hipskind, J.; Wood, K.; Nicholson, R. L. (1996). Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ester of luteolidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 49, p.21-31.

Prats, E.; Rubiales, D.; Jorrín, J. (2002). Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to sunflower rust (*Puccinia helianthi*) is associated with an enhancement of coumarins on foliar surface. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 60: 155-162.

Romeiro, R. S. Filho, R. L.; Vieira Junior, J. R.; Silva, H. S. A.; Baracat-Pereira, M. C.; Carvalho, M. G. (2005). Macromolecules released by a plant growth-promoting rhizobacterium as elicitors of systemic resistance in tomato to bacterial and fungal pathogens. *Journal of Phytopathology*. 153:120-123.

Steiner, U.; Schönbeck, F. (1995). Induced disease resistance in monocots. In: Hammerschmidt, R. e Kuc, J. (Eds.). *Induced resistance to disease in plants (Developments in plant pathology, V4)*. pp. 86-110.

Sticher, L.; Mauch-Mani, B.; Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 35:235-270.

Taiz, L.; Zeiger, E. (2004). *Fisiologia vegetal*. 3ed. Porto Alegre. Artmed Editora.

Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. H. M.; Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 36: 453-483.

Vieira Júnior, J. R. Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura. 2005. 146 f. Tese (Doutorado). - Universidade Federal de Viçosa. Viçosa.

Walling, L. L. (2001). Induced resistance: from the basic to the applied. *Trends in Plant Science*. 6: 445-447.

Weber, E.; Koebnik, R. (2006). Positive Selection of the Hrp Pilin HrpE of the Plant Pathogen *Xanthomonas*. *Journal of Bacteriology*. 188: 1405–1410.

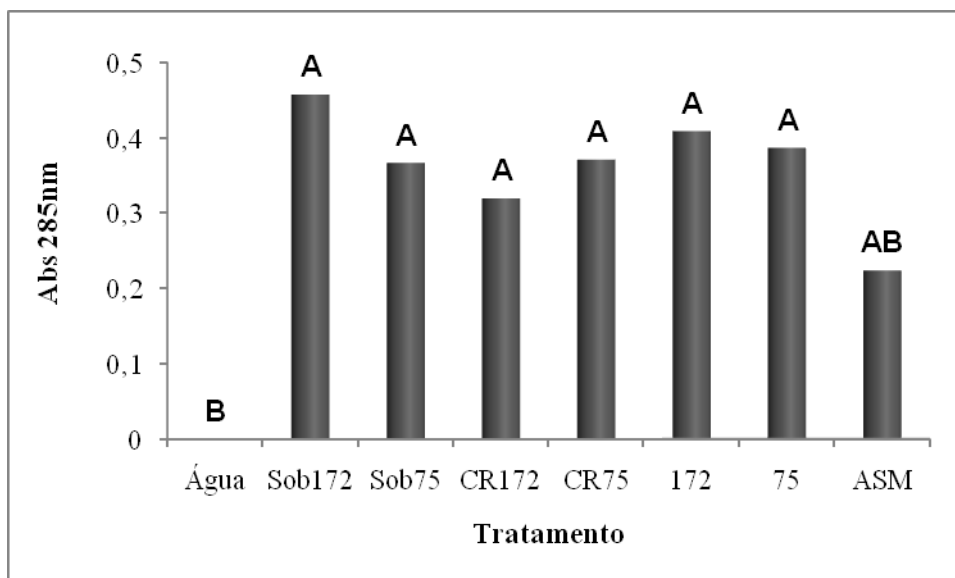


Figura 1 - Aumento na síntese de gliceolina em cotilédones de soja expostos a células vivas de isolamentos de UFV-172 (172) e UFV-075 (75), frações celulares de UFV-172 (CR172) e de UFV-075 (CR75); sobrenadantes de isolamento de UFV-172 (Sob172) e de UFV-075 (Sob75); acibenzolar-s-metil (ASM), pelo ensaio com cotilédones de Albershen e Valent (1978). Primeira repetição no tempo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%.

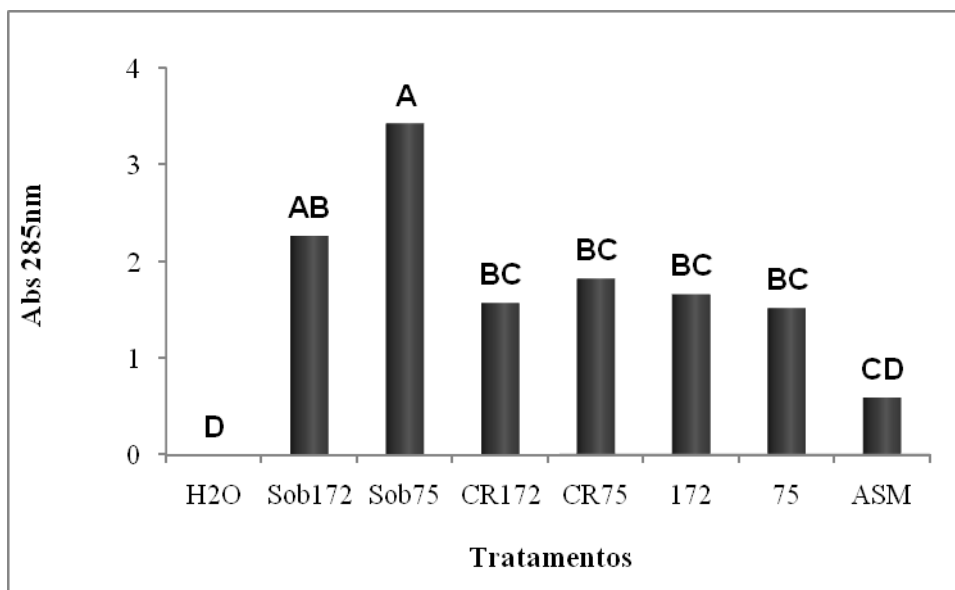


Figura 2 - Aumento na síntese de gliceolina em cotilédones de soja expostos a células vivas de isolamentos de UFV-172 (172) e UFV-075 (75), frações celulares de UFV-172 (CR172) e de UFV-075 (CR75); sobrenadantes de isolamento de UFV-172 (Sob172) e de UFV-075 (Sob75); acibenzolar-s-metil (ASM), pelo ensaio com cotilédones de Albershen e Valent (1978). Segunda repetição no tempo. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey 5%.

CONCLUSÕES GERAIS

- i) Os isolamentos de *Bacillus cereus* UFV-172, UFV-101 e UFV-075 e os de *Pseudomonas putida* UFV-053 e UFV-Pp foram eficientes no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) em condições de casa de vegetação, ao longo de 10 meses no ano de 2007.
- ii) A indução de resistência é um dos mecanismos envolvidos no biocontrole do crestamento bacteriano comum do feijoeiro pelos isolamentos UFV-172, UFV-101 e UFV-075. Nos ensaios, averigou-se a elevação da atividade de pelo menos uma enzima indicadora do estado de indução em plantas de feijão que tiveram seu filoplano exposto aos antagonistas. Observou-se o controle da doença quando houve separação espacial entre o patógeno e o antagonista.
- iii) Os isolamentos de *B. cereus* UFV-172, UFV-101 e UFV-075 e os de *P. putida* UFV-053 e UFV-Pp atuam como promotores de crescimento de feijoeiro. O aumento da produção pelo efeito dos antagonistas foi observado em ensaios de casa de vegetação e a campo. O incremento na produção, na presença e na ausência de fitopatógenos, indica que o efeito de promoção deve-se tanto a mecanismos diretos como a indiretos.
- iv) Os isolamentos de *B. cereus* UFV-172, UFV-101 e UFV-075 e os de *P. putida* UFV-053 e UFV-Pp foram capazes de controlar a mancha angular do feijoeiro (*Pseudocercospora griseola*), em dois períodos e para dois cultivares diferentes.
- v) No controle da ferrugem do feijoeiro (*Uromyces appendiculatus*), a co-dispensa do isolamento de *B. cereus* (UFV-075) e do isolamento de *P. putida* UFV-053 não demonstrou ser eficiente em aumentar a eficácia do controle.

- vi) A competição por nutrientes e por nicho está envolvida no mecanismo de controle do cretamento bacteriano comum do feijoeiro pelo isolamento UFV-172 de *B. cereus*.
- vii) Não foi possível avaliar a dinâmica populacional dos isolamentos de *B. cereus* (UFV-172 e UFV-075) e de *P. putida* (UFV-Pp). No ensaio realizado não se conseguiu determinar se a brusca queda populacional deveu-se à ineficiência da metodologia utilizada, ou se foi realmente a morte da população bacteriana dispensada no filoplano.
- viii) No ensaio com cotilédones de sojas observou aumento da síntese de gliceolina em cotilédones expostos à células viáveis, metabólitos e extratos celulares dos isolamentos de *B. cereus* (UFV-172 e UFV-075), demonstrando que a indução de gliceolina em cotilédones de soja pode ser importante ferramenta para auxiliar a evidência da eliciação de resistência induzida em plantas por bactérias antagonistas.