

## **EFEITO DO TRATAMENTO DE SEMENTES NATURALMENTE TRANSPORTANDO XANTHOMONAS FUSCANS SUBSP. FUSCANS COM BACTÉRIAS BIOCONTROLADORAS**

**FERNANDO H. UEHARA<sup>1</sup>; ISMAIL T. S. JÚNIOR<sup>2</sup>; MAURICIO SANGIOGO<sup>3</sup>;  
FLÁVIA C. BIGLIA<sup>4</sup>; ANDRÉA B. MOURA<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – fernando.uehara@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – agrojunior1@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – ms\_sangiogo@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – flaviabiglia0@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas – abmoura@ufpel.edu.br

### **1. INTRODUÇÃO**

O cretamento bacteriano comum (CBC), ocasionado pelas bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* - XAP e *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* - XFF, é considerado uma das doenças de maior importância para a cultura do feijão, sendo a principal dentro do grupo das bacterioses, podendo ocasionar perdas de até 70% (DIAZ, 2000). O controle do CBC é baseado principalmente em medidas preventivas, visto que o controle químico tem baixa eficiência, e o controle genético, pelo uso de cultivares resistentes é dificultado pela alta variabilidade do patógeno (MOURA; CORRÊA; DENARDIN, 2009).

A semente é o principal meio de sobrevivência e disseminação do patógeno, podendo a bactéria se localizar no interior, na superfície, bem como acompanhando as sementes. O patógeno pode sobreviver dois a quinze anos infectando sementes (WALLEN; GALWAY, 1979) e portanto medidas de controle que utilizem o seu tratamento apresentam grande potencial.

A maioria dos trabalhos buscando o biocontrole utiliza a microbiolização de sementes como forma de dispensar as bactérias nas plantas. Poucos trabalhos estudaram a redução da transmissão de patógenos para as plântulas pelo tratamento de sementes com bactérias biocontroladoras (CORRÊA et al., 2008; FESSEHAIE; WALCOTT, 2005). Adicionalmente, Sangiogo e colaboradores (2018) mostraram que pulverizações foliares dos biocontroladores DFs513, DFs769 e combinação C03 controlam o CBC quando aplicadas previamente à inoculação do patógeno nas folhas, no entanto, não se sabe qual seria o efeito desses biocontroladores usados para o tratamento de sementes naturalmente infectadas/infestadas pelo patógeno.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias biocontroladoras para o tratamento de sementes que transportam XFF/XAP.

### **2. METODOLOGIA**

Sementes de feijão (CNFP11976 – Lambari naturalmente infestadas/infectadas com XFF) provenientes de plantas com alta incidência de CBC receberam diferentes tratamentos bacterianos. Para tanto, as bactérias biocontroladoras (BBs) DFs348, DFs513, DFs769 e DFs831 foram cultivadas por 24 horas, suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e suas concentrações ajustadas para  $A_{540} = 0,50$ . A combinação foi constituída por 20 mL de suspensão de cada uma das BBs (DFs348, DFs769 e DFs831), cujas concentrações foram individualmente ajustadas, constituindo a combinação C03. O tratamento das sementes de feijão com BBs foi realizado em sacos plásticos foram adicionados 3,5 mL de suspensão das BBs e a testemunha, com solução salina.

Para avaliar o efeito do tratamento das sementes, foi determinado o Número Mais Provável (NMP) de sementes transportando XAP/XFF conforme descrito por Valarini & Menten (1990), bem como a população presente nas sementes segundo Manual de Análises Sanitárias (BRASIL, 2009). Adicionalmente, foi avaliada a transmissão do patógeno para as plântulas conforme descrito por Corrêa e colaboradores (2008) quando sementes foram dispostas individualmente em recipientes com vermiculita estéril, e acondicionados em caixas de plástico e mantidas em casa de vegetação. Após 15 dias foram contadas plântulas emergidas e determinada a transmissão do patógeno para as plântulas, observando os sintomas e confirmando a diagnose pela da exsudação em microscópio.

O experimento foi montado em um delineamento inteiramente casualizado, com parcelas de 12 sementes, em oito repetições, com ensaio repetido no tempo. Foi realizada análise pelo teste de Kruskal-Wallis, e os tratamentos foram comparados pelo método de Fisher. O nível de significância considerado foi de 5% de probabilidade. As análises foram realizadas no software R 3.5.1.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que o tratamento com água resultou no maior número de sementes com presença do patógeno, chegando a extrapolar os limites da tabela de avaliação do NMP. O tratamento com DFs769 apresentou o menor número de sementes transportando XFF/XAP na avaliação realizada com inoculação em vagens. Os tratamentos com DFs513 e C03 reduziram a incidência de sementes transportando o patógeno quando a avaliação foi feita por inoculação em vagens. Nas avaliações em placas, o tratamento com DFs769 também reduziu o NMP de sementes transportando o patógeno. Adicionalmente, os tratamentos DFs513, DFs769 e C03 reduziram a população média do patógeno em 86,5%, 77,37% e 63,9%, respectivamente, sendo que DFs513 e DFs769 diferiram significativamente da testemunha (Tabela 1).

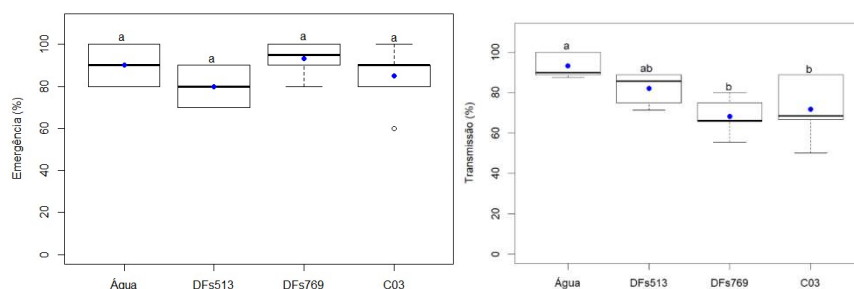
Não foi observado efeito significativo dos tratamentos de sementes com os biocontroladores na emergência das plântulas. No entanto, os tratamentos DFs769 e C03 proporcionaram uma redução significativa na transmissão de XFF/XAP para as plântulas. O tratamento DFs513 mostrou tendência a reduzir a transmissão do patógeno, porém o mesmo não diferiu significativamente da testemunha (Figura 1).

**Número de sementes transportando *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e sua população em lotes de sementes de feijão comum cv. CNFP11976 – Lambari, safra 2015/2016, tratadas com diferentes tratamentos biocontroladores.**

Tratamentos	NMP <sup>1</sup> - Vagens	NMP – Placas	UFC <sup>2</sup> /Sementes
Controle	>16,1 (3,9 - >45 <sup>3</sup> )	3,5 (1,2 – 10,1)	2,287 x 10 <sup>3</sup> a <sup>4</sup>
DFs513	16,1 (3,9 - >45)	3,5 (1,2 – 10,1)	0,307 x 10 <sup>3</sup> c
DFs769	1,4 (0,4 – 3,4)	1,2 (0,3 – 2,8)	0,517 x 10 <sup>3</sup> bc
C03	16,1 (3,9 - >45)	9,2 (9,2 – 21,7)	0,825 x 10 <sup>3</sup> ab

<sup>1</sup>NMP: Número Mais Provável; <sup>2</sup>UFC: Unidades Formadoras de Colônias; <sup>3</sup>Entre parênteses limites inferior e superior, em um intervalo de confiança de 95%; <sup>4</sup>Tratamentos com médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher. Controle, água estéril; DFs513, *Pseudomonas veronii*; DFs769, *Bacillus cereus*; C03, DFs348 (*Bacillus* sp.) + DFs769 + DFs831 (*Pseudomonas fluorescens*).

**Emergência de plântulas de feijão da cultivar CNFP11976, naturalmente infectadas/infestadas, e transmissão de *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* e/ou *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* de sementes para plântulas.**



DFs513, *Pseudomonas veronii*; DFs769, *Bacillus cereus*; C03, DFs348 (*Bacillus* sp.) + DFs769 + DFs831 (*Pseudomonas fluorescens*). Médias representadas por pontos em azul, medianas pelo traço na horizontal. Medianas seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis comparados pelo critério de Fisher, a 5% de probabilidade.

Sementes de feijão podem transportar XFF/XAP internamente e externamente. Quando o patógeno está presente na superfície das sementes pode ser mais facilmente afetado pelas BBs, seja por ação de antibióticos produzidos pelas bactérias, seja pela competição por espaço e nutrientes entre estas e o patógeno. A competição por espaço é um possível mecanismo de ação das BBs aqui usadas, uma vez que o isolado DFs769, por ser do gênero *Bacillus*, se multiplica mais rápido do que o patógeno. Zhang e Birch (1997), encontraram resultados que indicam que o isolado biocontrolador SB1403 (*Pantoea dispersa*) atua, em parte, pela competição no controle de *Xanthomonas albilineans*.

Quando o patógeno está presente internamente também pode ser alvo do biocontrole através da antibiose e competição. Microrganismos biocontroladores endofíticos, podem controlar doenças após sua inoculação em sementes, podendo colonizar sistemicamente o hospedeiro, reduzindo a transmissão do patógeno para as plântulas (PAL et al., 2019). No presente estudo, não foi avaliado se as BBs apresentam colonização endofítica, no entanto, não pode-se destacar essa possibilidade tendo em vista os vários trabalhos que tem abordado o efeito do tratamento de sementes visando o biocontrole, como exemplo tem-se trabalho de Carvalho et al. (2014), em que os autores comprovaram que o tratamento de sementes de feijão com *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* com isolados de *Trichoderma harzianum* reduziu a transmissão do patógeno nas sementes. Trabalho semelhante, mas utilizando o patossistema *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* x *Capsicum* spp., também comprovou a redução de incidência do patógeno (SHARMA, 2018). Ambos trabalhos corroboram com os resultados aqui encontrados.

No presente trabalho, ficou claro que o tratamento biocontrolador DFs769 apresentou potencial em reduzir a população, incidência e transmissão do patógeno. Não foram realizados ensaios que esclarecessem qual o mecanismo de atuação desse biocontrolador, no entanto trabalhos anteriores tem indicado que o isolado DFs769 atua como indutor de resistência ao CBC quando aplicado via foliar (SANGIOGO et al., 2018), apresenta antibiose direta ao isolado XFF28 (SILVA, et al., 2008) e rápido crescimento microbiano (característica da espécie), portanto, sugerimos que essa BB esteja atuando por meio da indução de resistência, antibiose e competição, ocasionando a redução da população do patógeno e sua transmissão.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi demonstrado que o tratamento biocontrolador DFs769 foi eficiente em proporcionar uma redução na incidência de sementes transportando o patógeno, bem como de sua população e na transmissão de XFF/XAP das sementes para plântulas, possuindo assim, potencial para o tratamento de sementes transportando o patógeno.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRASIL. Manual de análise sanitária de sementes. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2009. Disponível em: <<https://www.abrates.org.br/files/manual-de-analise-sanitaria-de-sementes.pdf>> . Acesso em: 9 set. 2019.
- CARVALHO, D. D. C.; LOBO JUNIOR, M.; MARTINS, I.; INGLIS, P. W.; MELLO, S. C. M. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 5, p. 384-391, 2014.
- CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B.; DENARDIN, N. A.; SOARES, V. N.; SCHÄFER, J. T.; LUDWIG, J. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p.156-163, 2008.
- FESSEHAIE, A.; WALCOTT, R.R. Biological control of watermelon seed infection by *Acidovorax avenae* subsp *citrulli*. **Phytopathology**, v. 95, n. 4, p. 413–419, 2005.
- MOURA, A.B.; CORRÊA, B.O., DENARDIN, N.D. Controle biológico de bactérias fitopatogênicas. **Informe Agropecuário**, v.251, p.7-14, 2009.
- PAL, G.; KUMAR, K.; VERMA, A.; WHITE J. F.; VERMA, S. K. Functional roles of seed-inhabiting endophytes of rice. In: VERMA S.; WHITE, JR J. (eds) **Seed endophytes**. Springer, Cham. 2019.
- SANGIOGO, M.; RODRIGUEZ, D. P.; MOCCELLIN, R.; BERMUDEZ, J. M. M.; CORRÊA, B. O.; MOURA, A. B. Foliar spraying with bacterial biocontrol agents for the control of common bacterial blight of bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.53, n.10, p.1101-1108, 2018.
- SILVA, E. G.; MOURA, A. B.; DEUNER, C. C.; FARIAS, D. R. Estudo de mecanismos de biocontrole do cretamento bacteriano do feijoeiro por bactérias. **Revista Ceres**, v. 55, p. 377-383, 2008.
- SHARMA, D. K. Bio-efficacy of fungal and bacterial antagonists against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye in chilli (*Capsicum* spp.) grown in Rajasthan. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n.2, p. 207-213, 2018.
- VALARINI, P. J.; MENTEN, J. O. M. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: métodos para detecção em sementes de feijão. **Fitopatologia Brasileira**, v. 17, p. 373-383, 1992.
- WALLEN, V.R., GALWAY, D.A. Effective management of bacterial blight of field beans in Ontario, a 10 years programme. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 1, p. 42-46, 1979.
- ZHANG, L.; BIRCH, R. G. Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 448-454, 1997.