

**INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA  
ALBA NISE MERÍCIA ROCHA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Bacillus amyloliquefaciens* e  
*Bacillus* sp À *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, CAUSADORA DA  
TUBERCULOSE EM OLIVEIRAS (*Olea europaea* L.), EM PORTUGAL.**

**SÃO JOÃO EVANGELISTA**

**2017**

**INSTITUTO FEDERAL DE MINAS GERAIS  
CAMPUS SÃO JOÃO EVANGELISTA  
ALBA NISE MERÍCIA ROCHA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Bacillus amyloliquefaciens* e  
*Bacillus* sp À *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, CAUSADORA DA  
TUBERCULOSE EM OLIVEIRAS (*Olea europaea* L.), EM PORTUGAL.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São  
João Evangelista como exigência parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Victor Dias Pirovani

**SÃO JOÃO EVANGELISTA**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S194a Santos, Alba Nise Merícia Rocha.  
2017

Avaliação do potencial antagônico de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus* sp à *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, causadora da Tuberculose em Oliveiras (*Olea europaea* L.), em Portugal. / Alba Nise Merícia Rocha Santos. – 2017. 36f. :il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista, 2017.

Orientador: Doutor Victor Dias Pirovani.

1. Fitobacterioses. 2. Biocontrole. 3. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. I. Santos, Alba Nise Merícia Rocha. II. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais – Campus São João Evangelista. III. Título.

CDD 581.2

Elaborada pela Biblioteca Professor Pedro Valério

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais  
Campus São João Evangelista

Bibliotecária Responsável: Rejane Valéria Santos – CRB-6/2907

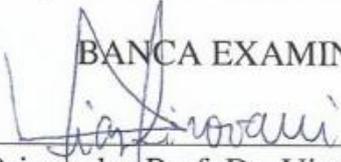
**ALBA NISE MERÍCIA ROCHA SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTAGÔNICO DE *Bacillus amyloliquefaciens* e  
*Bacillus* sp À *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, CAUSADORA DA  
TUBERCULOSE EM OLIVEIRAS (*Olea europaea* L.), EM PORTUGAL.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao  
Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São  
João Evangelista como exigência parcial para  
obtenção do título de Bacharel em Agronomia.

Aprovada em 23 de outubro de 2017

BANCA EXAMINADORA

  
Orientador Prof. Dr. Victor Dias Pirovani

Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São João Evangelista

  
Prof. Me. Alisson José Eufrásio de Carvalho

Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São João Evangelista

  
Profa. Dra. Natália Riso Fonseca

Instituto Federal de Minas Gerais – *Campus* São João Evangelista

“Se as cidades forem destruídas e os campos  
forem conservados, as cidades ressurgirão, mas se  
queimarem os campos e conservarem as cidades,  
estas não sobreviverão.”

Benjamin Franklin

À Deus pela graça da existência.  
Aos meus familiares principalmente a minha mãe, e amigos,  
...*Dedico* este trabalho com todo carinho e amor.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de estar aqui, pela saúde, família, conforto, esperança, alegria e pela proteção constante durante este caminho.

Aos meus pais, Angela Maria da Rocha Santos e José Matozinhos dos Santos pelo apoio, carinho, atenção, ensinamentos e paciência ao longo desses anos, sou grata a tudo que fazem por mim, amo-os mais que a mim mesma.

À minha irmã Mariele Rocha Santos pelo amor, atenção, conselhos e risadas.

Às bests Cleicimar Gomes, Kátia Cristina e Leandra Cardosoas melhores, serei sempre grata por tudo que passamos juntas, e por todo o aprendizado que cada empecilho nos proporcionou, obrigada por todo apoio que necessitei nos momentos mais difíceis.

Aos meus companheiros de caminhada Guilherme Rodrigues e Cleyton Oliveira pelos inúmeros momentos de ajuda oferecidos, agradeço-os imensamente por todos os momentos de alegria que passamos.

Ao Júlio César pelas horas de estudos furtadas ao seu convívio, e por tão bem compreender minhas privações.

Ao João Diogo Calado Martins Mina e à Paula Cristina dos Santos Baptista, pelo voto de confiança, incentivo e orientações ao longo do meu intercâmbio e na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Victor Dias Pirovani, pelo voto de confiança e orientação ao longo do caminho, possui minha gratidão e admiração.

Ao Instituto Federal de Minas Gerais - *Campus* São João Evangelista e todo o corpo docente pela oportunidade em continuar meus estudos com a obtenção de conhecimentos específicos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desta etapa de formação.

Muito obrigada!

## RESUMO

Novas alternativas para o controle de fitopatógenos tem sido buscadas em função do gradativo aumento dos custos do controle químico, assim como dos problemas ocasionados por tais. Dentre as doenças causadas por fitobactérias que acometem a cultura da oliveira (*Olea europaea* L.), destaca-se a tuberculose causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. O controle biológico surge como alternativa para o manejo de fitobacterioses, o qual baseia-se em métodos ambientalmente corretos, não sendo nocivo para o homem e para os animais, podendo fazer parte de um controle integrado de doenças. O presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias obtidas de diferentes olivais em produção com potencial para o biocontrole de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, através da avaliação do comportamento desses isolados contra a bactéria alvo em condições *in vitro* e *in vivo*. A fim de identificar o potencial antagônico das bactérias obtidas dos isolados em campo, foi realizado o teste de pareamento de culturas em condições *in vitro* em que linhagens de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus* sp. obtiveram efetividade antagônica. Para avaliação da influência dos biocontroladores na diminuição da severidade da tuberculose em oliveiras, realizou-se a avaliação 30 dias após a inoculação dos microrganismos nas plantas, onde os dados de massa fresca e seca (caule e raiz) foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância utilizando o software SISVAR. A inoculação do patógeno responsável pela tuberculose em oliveiras, assim como dos agentes de biocontrole não resultaram em doença nas plantas, possivelmente por consequência das temperaturas elevadas e baixa umidade relativa do ar em que os dias se encontravam quando inoculou-se as oliveiras. Os resultados das análises de avaliações da presença de bactérias endofíticas nos tecidos das amostras de plantas coletadas, não mostraram-se significativos quanto à presença de bactérias, o que corrobora para a não formação de tumores nas plantas inoculadas com o patógeno.

**Palavras-chave:** Fitobacterioses. Biocontrole. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

## ABSTRACT

New alternatives for the control of plant pathogens have been search due to the gradual increase of the costs in chemical control, as well as other problems caused by them. Among the diseases caused by phyto bacteria that affect olive trees (*Olea europaea* L.), it is highlight ed the tuberculosis caused by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Biological control emerges as an alternative for the management of the phyto bacteria, which is based on environmentally correct methods, not harmful to man and animals, and can be part of an integrated disease control. The present work aimed to select bacteria isolates obtained from different olive trees on production with potential for the biocontrol of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, through the evaluation of the conduction of the isolates against the target bacterium under in vitro and in vivo conditions. In order to identify the antagonistic potential of the bacteria obtained from the field isolates, we performed in vitro conditions, the crop pairing test where the *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus* sp. obtained antagonistic effectiveness. In order to evaluate the influence of biocontrollers on reducing the severity of tuberculosis in olive trees, the evaluation was performed 30 days after the inoculation of the microorganisms in the plants, where the data of fresh and dry mass (stem and root) were submitted to analysis of variance and the averages compared by the Tukey test at 5% significance using the SISVAR software. The inoculation of the pathogen responsible for tuberculosis in olive trees and biocontrol agents did not result in disease in the plants, possibly due to the high temperatures and low relative humidity of the days when the olive trees were inoculated. The results of the analysis of the evaluation of the presence of endophytic bacteria in the tissues of the collected plant samples were not significant in the presence of bacteria, which corroborates the non-formation of tumors in the plants inoculated with the pathogen.

**Keywords:** Phyto bacteriosis. Biocontrol. *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste de pareamento de culturas.....	24
Figura 2 – Inoculação.....	25
Figura 3 - Isolamento dos tecidos vegetais de <i>Olea europaea</i> L após inoculação.....	26

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição fenológica do desenvolvimento das plantas da oliveira <i>Olea europaea</i> L. em ciclo produtivo. ....	14
Tabela 2 - Tratamentos de inoculação de <i>P. savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> e agentes antagonistas em oliveiras cv. “Cobrançosa” ..	25
Tabela 3 - Resumo de análise de variância (ANOVA) das plantas após inoculação com antagonistas e <i>Pseudomona savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> . ....	27
Tabela 4 - Resumo de análise de variância (ANOVA) da avaliação da presença de bactérias endofíticas nos tecidos das amostras de plantas. ....	29

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	13
2.1	ASPECTOS BOTÂNICOS ( <i>Olea europaea</i> L.).....	13
2.2	A DINÂMICA DA CULTURA DA OLIVEIRA.....	15
2.3	DOENÇAS DA OLIVEIRA.....	15
2.3.1	Tuberculose ( <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>savastanoi</i> ).....	16
2.4	CONTROLE BIOLÓGICO.....	17
2.5	BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS.....	19
2.6	GÊNERO <i>Bacillus</i> COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO.....	20
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	32

## 1. INTRODUÇÃO

Com o gradativo aumento dos custos do controle químico, assim como os problemas ocasionados por tais, como por exemplo a poluição ambiental, a intoxicação do homem e animais, e o surgimento de patógenos resistentes a estes produtos, tem-se a necessidade de novas alternativas para o controle de fitopatógenos, como relatado por Vilasbôas (2009).

Dentre as doenças causadas por fitobactérias, que acometem a cultura da oliveira (*Olea europaea* L.), destaca-se a tuberculose causada pela bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (SARAMAGO, 2009). A bactéria penetra por ferimentos originados de poda, granizo, colheita com utilização de varas, enxertia e/ou geadas, causatumores e dificulta a circulação da seiva tendo como consequência, a não produção de frutos e ramos afetados, pode causar severa desfolha e em casos graves o secamento dos ramos (PINTO et al. 2013). Atualmente, a bactéria encontra-se disseminada por todas as zonas olivícolas de Portugal.

Para o controle da bacteriose indica-se o uso de cultivares resistentes, supressão dos ramos atacados, desinfestação dos ferimentos e dos utensílios de corte, evitar ferimentos com vara durante colheita, assim como quaisquer outros tipos de lesões, conforme indica Saramago (2009). Em Portugal há inexistência de produtos químicos homologados para controle da bacteriose.

Visando a busca de alternativas para o manejo de fitobactérias, sistemas agrícolas produtivos subsidiados pelo que consideram-se boas práticas agrícolas, além do melhoramento genético clássico, investigações que se valem do manejo de microrganismos fitopatogênicos constituem estratégias promissoras, pois estes possuem ampla ação sobre o espectro de fitopatógenos (VILASBÔAS, 2009).

A utilização de agentes de controle biológico insere-se no agronegócio em substituição ou complementação aos pesticidas químicos sintéticos no manejo integrado de doenças. Sua utilização pode aumentar a qualidade do produto agrícola reduzindo a poluição do meio ambiente, contribuindo para a preservação dos recursos naturais e aumentando a sustentabilidade dos agroecossistemas (VILASBÔAS, 2009).

Ressalta-se o controle biológico como alternativa para o manejo de fitobacterioses, o qual baseia-se em métodos ambientalmente corretos, não sendo nocivo para o homem e para os animais, podendo fazer parte de um controle integrado de doenças de plantas (MELO, 1998). O controle biológico é realizado através da utilização de agentes microbianos que possuem potencial antagônico contra microrganismos considerados como patógenos de uma determinada cultura, através de mecanismos de antagonismo que inibem o patógeno, podendo

este antagonista ser efetivo para uma espécie de microrganismo ou ter seletividade para vários microrganismos.

Visando a possibilidade de controle biológico de tuberculose das oliveiras (*Olea europaea* L.) na cultivar “Cobrançosa”, o presente trabalho teve como objetivo selecionar bactérias obtidas de diferentes olivais em produção com potencial para o biocontrole de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, através da avaliação do comportamento desses isolados contra a bactéria alvo em condições *in vitro* e *in vivo*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

Serão abordados no presente item aspectos relevantes sobre a cultura da oliveira, principais doenças, uso do controle biológico e o papel que este possui em uma produção aferindo resistência às plantas.

### 2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS (*Olea europaea* L.)

A oliveira (*Olea europaea* L.), cultura típica da agricultura mediterrânea, tem a sua origem na Ásia menor, tendo-se difundido pelo Norte de África e Sul da Europa. Posteriormente, espalhou-se pela bacia mediterrânea sendo levadas até o continente americano pelos portugueses e espanhóis (FERGUSON et al. 1994 *apud* SARAMAGO, 2009).

As plantas de oliveiras pertencem à família botânica Oleaceae, com espécies de plantas distribuídas pelas regiões tropicais e temperadas de todo o Mundo, sendo maioritariamente árvores e arbustos. O gênero *Olea* compreende 35 espécies diferentes, entre elas *Olea europaea* L., que produz frutos comestíveis (BARRANCO et al. 2004).

A forma do sistema radicular da oliveira depende da origem da árvore e das condições de solo a que esta é submetida. O sistema radicular quando originado de semente é constituído por uma raiz apical. Após o transplante, a raiz principal atrofia e desenvolvem-se as raízes secundárias, tornando-se o sistema radicular fasciculado e superficial. As plantas obtidas através de estacas originam logo três a quatro raízes idênticas, que após o transplante tem igual desenvolvimento, ficando com o sistema radicular fasciculado (GARCIA, 2000).

Em solos for de textura arenosa, o sistema radicular atinge maiores profundidades do que em solos de textura argilosa, desenvolvendo-se entre 15 a 20cm mas podendo atingir 80 cm de profundidade (GARCIA, 2000).

Segundo Garcia (2000), os troncos das árvores jovens tem uma forma circular e apresentam córtex liso com uma cor verde acinzentada, variando segundo a cultivar e a zona climática onde está instalada. Mas, à medida que vai envelhecendo, o tronco deforma-se, tornando-se irregular, e o córtex desenvolve-se de forma não uniforme, ficando então o tronco com uma tonalidade escura.

As folhas da oliveira são persistentes e normalmente sobrevivem dois a três anos, permanecendo também na árvore folhas de maior idade. São simples, inteiras, de pecíolo curto, limbo lanceolado e nervura central marcada, apresentando uma coloração verde mais

ou menos escuro na face superior e branco prateado ou branco sujo na face inferior (BARRANCO et al. 2004).

As flores encontram-se agrupadas em inflorescência do tipo cacho, variando o número de flores de acordo com a cultivar, sendo que o número de cachos também é variável em cada ramo (BARRANCO et al. 2004).

O fruto da oliveira, a azeitona, botanicamente é uma drupa. Trata-se de um fruto formado por uma única semente e três tecidos principais: epicarpo, mesocarpo e endocarpo. Apresenta uma coloração preta a verde arroxeadado segundo a cultivar. Encontra-se suspenso no ramo pelo pé ou pedúnculo (BARRANCO et al. 2004).

A oliveira ao longo do ano apresenta vários estados fenológicos segundo Lopes (2015), apresentados na Tabela 1. A apresentação dos estados fenológicos da oliveira faz-se necessário, através deles podem-se determinar as exigências nutritivas, como aplicações de nitrogênio, boro e potássio, necessidade hídrica, e prejuízos de pragas e doenças, bem como as intervenções a serem realizadas, neste caso, as quais ocorrem essencialmente do estágio G ao estágio I.

Tabela 1 - Descrição fenológica do desenvolvimento das plantas da oliveira *Olea europaea* L. em ciclo produtivo.

<b>Estádio</b>	<b>Descrição</b>
<b>A</b>	Estado invernal: Gomos terminais e axilares estão em repouso vegetativo;
<b>B</b>	Início vegetativo: Gomos terminal e axilares mostram início de crescimento;
<b>C</b>	Aparecimento dos botões florais: Cacho mostra diferentes verticilos de botões;
<b>D</b>	Formação da corola: Botão floral mostra-se inchado, o cálice abre-se e começa a ver-se a corola que chega a ser maior do que o cálice;
<b>E</b>	Aparecimento dos estames: O botão floral continua a inchar, a corola começa a abrir sendo possível ver-se os estames ao fundo;
<b>FI</b>	Início da floração: Desabrocham as primeiras flores;
<b>FII</b>	Plena floração: A maioria das flores estão abertas e há abundância de emissão de pólen;
<b>G</b>	Vingamento: Ovário fecundado aumenta de tamanho e notam-se claramente os frutos formados, as pétalas murcham e caem;
<b>H</b>	Lenhificação do caroço: O fruto atinge metade do seu tamanho final;
<b>I</b>	Início da maturação: O fruto atinge o seu tamanho normal e o epicarpo fica 50% violáceo;
<b>J</b>	Maturação do fruto: O fruto escurecido de negro, a intensidade depende da variedade.

Fonte: Adaptado de LOPES(2015).

## 2.2 A DINÂMICA DA CULTURA DA OLIVEIRA

A cultura da oliveira sempre teve um papel crucial no desenvolvimento econômico dos países mediterrânicos, tendo ainda hoje importância significativa em países deste clima. O consumo mundial de azeitonas de mesa para os últimos 25 anos tem-se multiplicado por 2,8, com aumento de 173% durante o período entre 1990-1991 e 2015/16, como resulta do mais recente relatório de mercado do *International Olive Council* (2016).

O azeite é um produto alimentar rico em vitamina E e outros antioxidantes, utilizado como tempero uma vez que dá à comida um sabor e aroma peculiares. É produzido a partir da azeitona, fruto da oliveira (FERRAZ, 2010).

Cerca de 95% da superfície oleícola mundial está concentrada na Bacia Mediterrânica, sendo a União Europeia responsável por 75% da produção mundial de azeite. Portugal produziu 91.647t de azeite em 2013, correspondendo a 999.853hl (taxa de conversão do Azeite - 1hl = 91.66 Kg) e, em 2014 um valor de 60.984t a que correspondem 665.325hl, registando-se assim uma quebra de cerca de 33,5% relativamente à campanha anterior. No entanto, dados do Instituto Nacional de Estatística, apontam para uma produção de azeite em 2015 de 1.016hl (“o valor de produção anual mais alto”), segundo dados do Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (2016).

As exportações para o Brasil ocupam um lugar de destaque nas exportações de azeite com 44% das exportações deste produto em 2014, no total de 44.722t, com um valor de 165M€ (M corresponde a um fator multiplicador de um milhão), e em 2015 com 32.778t, com um valor de 140M€, conforme dados do Gabinete de Planeamento, Políticas e Administração Geral (2016).

## 2.3 DOENÇAS DA OLIVEIRA

Em qualquer ecossistema existem vários fatores que contribuem para o aparecimento e desenvolvimento de doenças, desde o inóculo, condições ambientais, ao uso e abuso de pesticidas que podem levar ao desequilíbrio ecológico. Outros fatores importantes são as intervenções culturais que conduzem a grandes alterações a nível do microclima, influenciando, quase sempre, negativamente a fauna local (LOPES, 2015).

Assim o agricultor tem de minimizar os efeitos das doenças recorrendo a meios biológicos, físicos, mecânicos e em último caso a meios químicos, priorizando a sua saúde e a dos animais, estabelecendo métodos que permitam obter bons resultados com o mínimo de intervenção (VILASBÔAS, 2009).

No olival, conforme relatado por Lopes (2015) as principais doenças são o olho de pavão causado por *Spilocara oleagina* Castagne, a gafa, causada por *Colletotrichum acutatum* (J.H. Simmonds) e *C. gloeosporoides* (Penzig) e a tuberculose, causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (ex Smith).

### 2.3.1 Tuberculose (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*)

A tuberculose da oliveira, *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (ex Smith), vulgarmente conhecida por ronha ou lepra está distribuída por todas as zonas olivícolas de Portugal (LOPES, 2015). A disseminação da doença pode ser feita logo na instalação do olival através de plantas infectadas.

A bactéria possui forma de bastonete com extremidades arredondadas e um a quatro flagelos, com dimensões médias de 0,4 a 0,8 µm X 1,2 a 4,5 µm (CANTERO, 1997; TRAPERO e BLANCO, 2004). Esta bactéria está presente na superfície de vários órgãos da oliveira, principalmente na folhagem (PROTA, 1995) e penetra nos tecidos através de ferimentos na epiderme provocadas por geadas, granizo, podas, colheita da azeitona, ataques de pragas e queda natural das folhas (CANTERO, 1997; TRAPERO e BLANCO, 2004).

A doença desenvolve-se pela infecção da estirpe virulenta e da ativação dos genes da planta que sintetizam auxinas, nomeadamente o ácido indolacético, e citoquininas responsáveis pela multiplicação desordenada das células infectadas da oliveira levando à formação dos tumores (AGRIOS, 2005). A dispersão do *P. savastanoi* pv. *savastanoi* é feita através da chuva e da elevada umidade relativa, das partes mais altas para as partes mais baixas. A disseminação do mesmo agente pode ser feita através do vento para árvores vizinhas e para locais longínquos é feita por insetos e por uso de utensílios de poda e colheita da azeitona (CANTERO, 1997). A temperatura ótima para a infecção é próxima de 23 a 24°C, de ocorrência comum durante a primavera e o outono (TRAPERO e BLANCO, 2004).

O ataque da tuberculose provoca tumores em ramos jovens, de forma mais ou menos arredondada, pequenos no início, de cor esverdeada e superfície lisa. À medida que ocorre o processo de evolução da doença, os tumores dos ramos e tronco apresentam maiores dimensões, fissuras profundas e lenhosas com tecido escurecido e suberizado, onde se podem instalar outras pragas (LOPES, 2015). Provocam ainda, o enfraquecimento dos ramos onde se desenvolvem os tumores, com consequências negativas no vigor das árvores e, conseqüentemente, na produção, causando ainda desfolha e nos casos mais graves, a morte dos ramos e das plantas jovens como relatado por Alcobia e Ribeiro (2001), Trapero e Blanco

(2004) e Torres (2007). A doença pode provocar modificações nas características organolépticas do azeite, como o cheiro de ranço e o sabor amargo, rançoso ou salgado.

O controle dessa doença é realizado através de medidas preventivas através da utilização de cultivares tolerantes ou mais resistentes à tuberculose; evitando-se práticas de fertilizações nitrogenadas excessivas, assim como técnicas culturais que provoquem lesões nas árvores, como a poda com tempo seco, sendo que quando necessárias devem possuir início pelas oliveiras que encontram-se em melhores condições sanitárias. Para o controle químico da doença não existem produtos homologados em Portugal. A colheita, sempre que possível deve ser mecânica para evitar a técnica com utilização de varas, as quais provocam lesões e feridas nos ramos, constituindo-se assim em porta de entrada para fungos e bactérias (LOPES, 2015).

Conforme Saramago (2009), o controle biológico e cultural são essenciais. Associadas às medidas preventivas, diferentes estratégias podem ser utilizadas para o controle de doenças, tais como o emprego de agentes de controle biológico e/ou de indução de resistência.

O uso de microrganismos antagonistas a diferentes fitopatógenos, com ação direta sobre o patógeno e/ou ativando os mecanismos de defesa da planta, tem sido alternativa promissora no manejo de doenças de plantas. Esse tipo de microrganismo tem tido importante papel no controle de bactérias e de fungos fitopatogênicos, também utilizados como bioinseticidas, como referido por Torres (2007).

## 2.4 CONTROLE BIOLÓGICO

A comercialização de defensivos agrícolas tem-se apresentado em crescimento expressivo no mundo nos últimos anos, o que mostra a importância do controle de fitopatógenos e a necessidade de desenvolvimento e introdução de alternativas de manejo. Entre essas alternativas destaca-se o controle biológico (MICHEREFF, 2001).

O controle biológico de doenças de plantas pode ser conceituado como o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo. Entretanto, conceitos mais abrangentes são aceitos pelos fitopatologistas. O controle biológico de doenças de plantas, no conceito abrangente apresentado por Cook e Baker (1983), pode ser definido como:

“ a redução da soma de inóculo ou das atividades determinantes da doença, provocada por um patógeno, realizada por um ou mais organismos que não o homem.”

Deste modo, as atividades determinantes da doença envolvem crescimento, infectividade, agressividade, virulência e outras características do patógeno ou processos que

determinam infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução. Os organismos incluem indivíduos ou populações avirulentas ou hipovirulentas dentro das espécies patogênicas e antagonistas (MARIANO et al. 2000). Ressalta-se ainda, como alternativa para o manejo de fitobacterioses, por se basear em métodos ambientalmente corretos, não sendo nocivo para o homem e para os animais, podendo fazer parte de um controle integrado de doenças (VILASBÔAS, 2009).

O controle biológico de doenças de plantas tem sido usado de forma empírica desde a antiguidade (COOK e BAKER, 1983). Segundo esses autores, os egípcios já faziam uso dessa prática de modo intuitivo. O uso de microrganismos procariotos para o controle de doenças de plantas de forma científica e direcionada iniciou-se apenas há algumas décadas (VILASBÔAS, 2009).

Antagonista é um agente biológico com potencial para interferir nos processos vitais dos fitopatógenos. O antagonista pode ter especificidade como no caso dos vírus atenuados utilizados para proteção cruzada ou serem ativos contra vários patógenos como algumas Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPR) (MARIANO et al. 2000).

Os mecanismos de biocontrole são as interações antagônicas através das quais os antagonistas ativamente expressam oposição aos patógenos e reduzem a ocorrência das doenças. Na maioria dos casos, os antagonistas são empregados com sucesso, como agentes de biocontrole sem conhecimento dos mecanismos de ação envolvidos (MELO, 1996).

Os mecanismos envolvidos no controle biológico podem ser parasitismo direto, predação, competição por nutrientes e ambiente, antibiose e produção de substâncias antibióticas e bacteriocinas, metabólitos ácidos ou tóxicos, indução de resistências (ROMEIRO, 1995; MELO, 1998; SILVEIRA, 2001).

A antibiose é a interação entre organismos, na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm um efeito negativo sobre o outro, inibindo a germinação e crescimento ou inativando a célula por toxicidade química. Os antibióticos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que, em baixas concentrações, são deletérios ao crescimento ou a outras atividades metabólicas de outros organismos. Várias espécies de bactérias são conhecidas como sendo eficientes produtoras de antibióticos entre essas as dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, entre outros (MELO, 1998).

A competição envolve a interação entre dois ou mais organismos na disputa por nutrientes e por espaço, tanto na esferosfera quanto na rizosfera e filoplano. A competição por espaço se dá, principalmente, pela ocupação dos sítios de colonização e a competição por nutrientes, pelos três elementos essenciais para a maioria dos patógenos: carbono, nitrogênio e

ferro. A competição por carbono e por nitrogênio, aparentemente, pode ocorrer com todos os grupos de bactérias promotoras de crescimento de plantas. Entretanto, as bactérias do gênero *Pseudomonas* são os principais microrganismos que apresentam a competição pelo  $Fe^{+3}$ , realizada por sideróforos, como mecanismo de biocontrole de diversas doenças, como murcha vascular em cravo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* W.C. Snyder e H.N. Hansen, 1940), tombamento de plântulas em algodão (*Pythium ultimum* Trow, 1901) e murcha do pepino (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen, 1956) (MELO, 1998).

O parasitismo é a interação entre dois organismos, onde um dos organismos sobrevive às custas do outro, a espécie parasita produz enzimas líticas que degradam a parede celular dos hospedeiros. Pode ocorrer sobre estruturas vegetativas, reprodutivas e de sobrevivência, reduzindo a infecção e o inoculo do patógeno (LUZ, 1996).

## 2.5 BACTÉRIAS ASSOCIADAS A PLANTAS

As plantas constituem um verdadeiro ecossistema microbiano. Nestas plantas, diferentes nichos são ocupados pelos microrganismos, tais como as superfícies das raízes e folhas (as epífitas), ou então, estas colonizam o interior de diversos tecidos das plantas (endofíticas). As bactérias que vivem no interior das plantas podem ser divididas em dois grupos, com base na sua relação com o hospedeiro (SOBRAL, 2003). O primeiro grupo é o das bactérias endofíticas que são geralmente definidas como aquelas que vivem no interior das plantas sem causar danos visíveis (HALLMANN et al. 1997). Esse conceito as diferencia do outro grupo de bactérias que, apesar de também viver no interior da planta podem causar doença, trazendo prejuízo ao seu hospedeiro. Pode-se afirmar que as diferenças entre bactérias endofíticas, epifíticas e fitopatogênicas são apenas de natureza didática, não existindo um limite claro entre grupos e sim um gradiente entre eles, pois existem algumas populações bacterianas que podem flutuar entre a colonização endofítica e epifítica. Dependendo das condições ambientais ou equilíbrio com outros endófitos, uma bactéria endofítica pode se tornar um patógeno e uma bactéria epifítica pode, eventualmente, entrar numa planta e lá permanecer endofítica ou causando danos às mesmas (ANDREWS e HARRIS, 2000; SABARATNAM e BEATTIE, 2003; KLOEPPER et al. 1992).

Bactérias endofíticas e epifíticas podem contribuir para o crescimento, a sanidade e o desenvolvimento vegetal. A promoção de crescimento vegetal pode ser resultante tanto de ações diretas como controle biológico por competição de nutrientes, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN LOON et al. 1998) como de ações indiretas, como

disponibilização de nutrientes para a planta, fixação de nitrogênio atmosférico e a produção de reguladores de crescimento vegetal (SILVEIRA, 2001).

Os microrganismos endofíticos possuem uma grande vantagem em relação aos epifíticos ao colonizar as plantas, pois os tecidos internos proporcionam um ambiente protegido das adversidades do meio, como raios ultravioleta, chuvas e flutuações de temperatura, bem como, maior disponibilidade de nutrientes, evitando assim competição com outros microrganismos. Logo, endofitismo pode ser visto como uma forma evolutiva para sobrevivência desses microrganismos (VILASBÔAS, 2009).

Os microrganismos epifíticos, habitantes das superfícies dos órgãos das plantas, agem como tampão biológico, prevenindo o patógeno de infectar o hospedeiro, por este fato conclui-se que o controle biológico ocorre naturalmente (BETTIOL, 1991).

A seleção de microrganismos antagônicos em programas de controle biológico constitui a base fundamental de estudos, os quais podem vir a determinar o sucesso da implantação de determinada cultura. Todos os métodos de seleção de agentes de biocontrole são baseados em evidências de que o organismo candidato interfere de algum modo, no desenvolvimento do patógeno ou reduz a doença, sendo que a interferência implica em algumas formas de inibição, podendo ser avaliada tanto *in vitro* como *in vivo* conforme Torres e seus colaboradores (2007).

## 2.6 GÊNERO *Bacillus* COMO AGENTE DE CONTROLE BIOLÓGICO

Segundo Cawoy e colaboradores (2011), biopesticidas microbianos possuem grande potencial para o futuro da agricultura sustentável. Muito trabalho já foi realizado e muito ainda será conquistado por pesquisadores e indústrias, para melhorar a confiabilidade e eficácia desses produtos para manter o mercado sempre crescente.

Linhagens pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem a capacidade de produzir esporos, (PIGGOT e HILBERT, 2004), isso significa que esses microrganismos possuem uma forma de dormência extremamente resistentes, sendo capazes de suportar altas temperaturas, pH desfavorável, falta de nutrientes ou água (CAWOY et al. 2011).

No entanto, biopesticidas produzidos com *Bacillus* sp., possuem pontos fracos como, oferecer proteção parcial contra patógenos e ataques de pragas e apresentar efeito inconsistente, por ser um organismo vivo a base do produto, sua eficácia depende muito das condições ambientais de aplicações em comparação aos pesticidas convencionais. Em contrapartida, possuem pontos fortes como, por exemplo, a ocorrência de interações benéficas

entre a planta hospedeira, o ambiente e o antagonista contra o patógeno (BUTT et al. 1999; FUENTES-RAMIREZ e CABALLERO-MELLADO, 2006).

De acordo com o banco de dados “*List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*” existem atualmente 336 espécies e sete sub-espécies de microrganismos do gênero *Bacillus* com descrição válida de acordo com o manual de Bergey’s, que sistematiza a classificação taxonômica de procariotos (EUZÉBY, 2017).

Devido às características peculiares estes microrganismos têm sido empregados na agricultura, aumentando a resistência de plantas a diversos estresses ambientais como seca, metais pesados e escassez nutricional do solo (CLEMENTE et al. 2016).

No controle de pragas *Bacillus thuringiensis* é mais amplamente utilizado, pois podem produzir diversos tipos de toxinas com especificidade seletiva para diferentes espécies de insetos (MADIGAN et al. 2016). *B. thuringiensis* produz uma proteína cristalizada durante o processo de esporulação. Esta proteína é uma protoxina convertida em toxina no intestino de lepidópteros, o que torna uma eficaz solução para o controle de *Helicoverpa armigera*, uma importante praga da cultura da soja, milho e algodão (WANG et al. 2016; LUO et al. 2017). Desta forma, genes *cry* que codificam as proteínas cristal ou toxina Bt como é conhecida a protoxina, foram introduzidos em variedades de soja, algodão e milho geneticamente modificadas para resistência contra o ataque de *Anticarsia gemmatalis*, *H. Armigera*, entre outras (DOVRAT; AHARONI, 2016; WANG et al. 2016).

No controle de doenças de plantas causadas principalmente por fungos fitopatogênicos, o gênero *Bacillus* é largamente empregado como um importante agente de antagonismo. A podridão de raiz e haste causada pelo patógeno *Phytophthora sojae* é uma destrutiva doença na cultura da soja. Apesar da gravidade das perdas causadas por este oomiceto, não existem métodos efetivos disponíveis para controlar esta doença (QIAO et al. 2013). Porém, Lu et al. (2017) mostraram que *Bacillus altitudinis* pode efetivamente reduzir a infectividade de *P. sojae*, devido a produção de espécies reativas de oxigênio e deposição de calose, em plantas de soja. Este resultado mostra uma promissora perspectiva no controle de *P. sojae*, embora testes em campo ainda devam ser reproduzidos.

O fungo *Fusarium graminearum*, um dos principais patógenos de cereais, é responsável por grandes perdas econômicas em diversos cultivos de grãos e, além disso, causa problemas para a saúde humana e animal (BRESSO et al. 2016). Para controlar este fitopatógeno, Palazzini et al. (2016) selecionou uma linhagem de *Bacillus subtilis* isolado de planta de trigo com forte potencial de antagonismo e biocontrole contra infecções ocasionadas por *Fusarium graminearum*.

León et al. (2009) selecionaram uma linhagem de *Bacillus amyloliquefaciens* isolada da rizosfera de plantas de soja que foi capaz de inibir o patógeno *Pythium ultimum*, responsável pela podridão de raízes e tombamento do caule em plantas de soja.

Em estudo realizado por Senthilkumar et al. (2009), uma linhagem de *Bacillus* spp. mostrou forte inibição de patógenos de solo causadores de podridão em plantas de soja. Além de atuar como promotor de crescimento em plantas e aumentar a taxa de germinação, a estirpe selecionada foi capaz de inibir o crescimento de *Rhizoctonia bataticola*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium udam* e *Sclerotium rolfsii*.

Calvo et al. (2017) selecionaram uma linhagem de *B. amyloliquefaciens* com forte ação inibitória contra patógenos de pós-colheita de laranja, maçã, uva, pêssego e ameixa. *B. amyloliquefaciens* é capaz de produzir forte ação antifúngica *in vitro* e *in vivo* contra *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* e *Penicillium italicum*. Outra linhagem de *B. amyloliquefaciens* (PGPBACCA1) foi identificada como um eficaz agente de controle biológico para sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) contra os patógenos *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Cladosporium* spp. E *Rizhopus* spp., *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Penicillium* spp. (TORRES et al. 2017).

Assim, a utilização de espécies de *Bacillus* como promotoras de crescimento e agente de controle biológico para diversas culturas agrícolas, proporciona um método atrativo, eficiente e ambientalmente menos agressivo que o uso de defensivos químicos, o que torna a utilização de bioagentes uma alternativa mais sustentável nos âmbitos econômicos e ambientais (SHAFI et al. 2017).

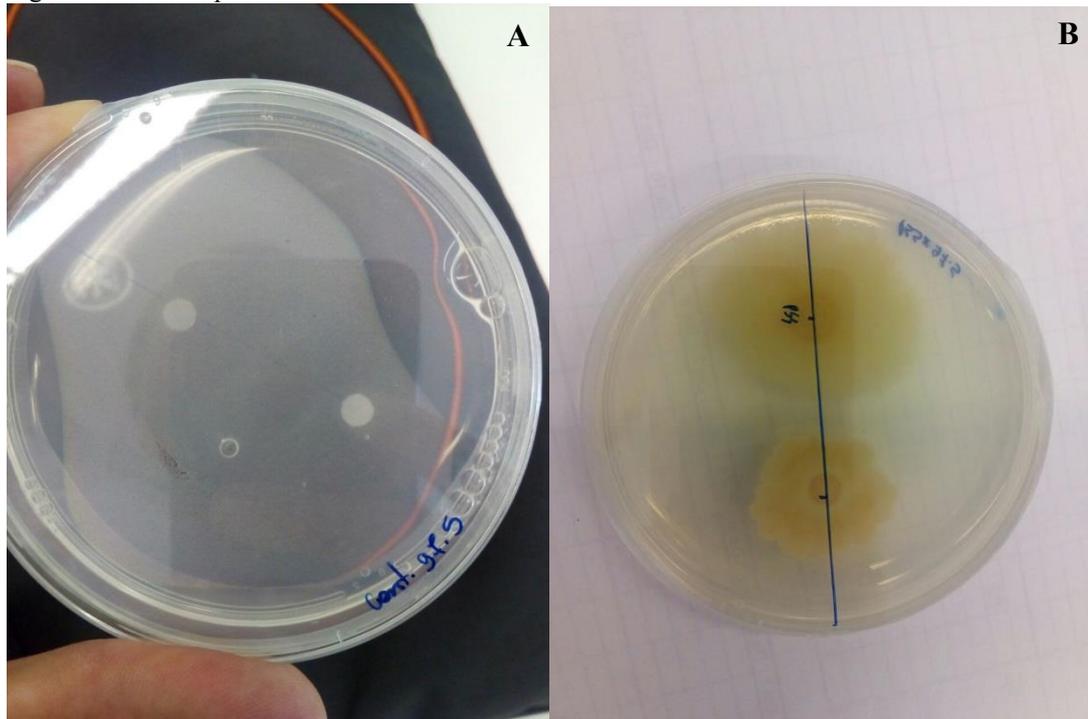
### 3. METODOLOGIA

Conduziu-se o experimento nos meses de março a agosto de 2017, no Centro de Investigação da Montanha (CIMO) e em casa de vegetação no setor de produção de mudas do Instituto Politécnico de Bragança (IPB) – *campus* Santa Apolónia, em Portugal, situada a uma altitude média de 690m, latitude 41°48.3492' norte e longitude 6°45.4314' oeste. O clima é Csb, clima temperado úmido com verão seco e temperado, segundo a classificação de Köppen.

Isolou-se os microrganismos a partir de amostras de pequenos fragmentos vegetais de oliveiras (*Olea europaea* L.) cultivar “Cobrançosa” (folha, caule, raiz, entre outros) coletadas, anteriormente em campo, na região de Trás-os-Montes. Após o processo de desinfestação com utilização de hipoclorito de sódio segundo metodologia de Hallmann et al. (2006), os fragmentos foram isolados, em condições de assepsia, em placas de Petri<sup>®</sup> contendo meio de cultura Luria-Bertani Broth (LB). Posteriormente as caixas foram incubadas em uma câmara de crescimento a 30°C, monitoradas diariamente quanto ao crescimento microbiano. A partir do desenvolvimento das colônias bacterianas, repicou-se até obtenção de culturas puras.

A fim de identificar o potencial antagonístico das bactérias obtidas das amostras, procedeu-se em condições *in vitro*, o teste de pareamento de culturas proposto por Gomes et al. (2001). Após crescimento bacteriano das linhagens de *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus* sp.nos respectivos meios de cultivo, preparou-se uma suspensão em meio LB líquido (*overnight*), onde cada bactéria foi diluída até  $Abs_{600}=0.5$  foi adicionada 5µL dessa suspensão em discos de papel filtro com 5 mm de diâmetro que foram dispostos em novas caixas de Petri<sup>®</sup> com meio de cultivo LB, sendo que foi dividida ao meio e em um dos lados foi adicionado um disco de cultura do patógeno *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* e no outro, um disco de cultura do antagonista, em análise em posições opostas colocados a uma distância de 3 cm da borda da placa (Figura 1A). Após a transferência, as placas foram mantidas em câmara de crescimento a 30° C por sete dias, onde avaliou-se com medições periódicas dos halos de inibição formados, o potencial antagonista de cada candidato (Figura 1B). Como controle negativo, foi colocado um disco de papel de filtro com 5 mm de diâmetro em placas contendo meio de cultura, onde inoculou-se cada cultura bacteriana individualmente.

Figura 1 –Teste de pareamento de culturas.



A) Disposição dos discos de papel filtro. B) Halos de inibição das bactérias após 7 dias. **Fonte:** O autor.

A identificação das bactérias isoladas baseou-se na amplificação do gene 16S que codifica o RNA ribossômico (rRNA), seguida do seu sequenciamento (ARAÚJO et al. 2002; FISHER et al. 1998; MAGNANI et al. 2010). O sequenciamento do DNA das amostras isoladas, foi realizado no laboratório STABvida localizado na Universidade Nova de Lisboa, Lisboa em Portugal. Em relatório gerado no laboratório foi encontrado espécies dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Agrococcus*, *Pseudoclavibacter*, *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Frondehabitans*, *Serratia*, *Brevundimonas*, *Sporosarcina*, *Advenella*, *Kocuria*, *Plantibacter*, *Paenibacillus* e *Xanthomonas*.

Para avaliar a eficiência dos isolados obtidos foi realizada a inoculação de duas bactérias antagonistas do gênero *Bacillus* e da bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* em plantas da cultivar “Cobrançosa” com um ano de idade onde se adotou o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos arranjados em esquema fatorial 3×2, sendo utilizados os agentes antagonistas *Bacillus amyloliquefaciens* (antagonista 1) e *Bacillus* sp. (antagonista 2) e uma testemunha (sem inoculação do antagonista), com ou sem a inoculação de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, com cinco repetições (Tabela 2).

Tabela 2 - Tratamentos de inoculação de *P. savastanoi* pv. *Savastanoi* e agentes antagonistas em oliveiras cv. “Cobrançosa”.

Tratamentos	Descrição	Quantidade( $\mu$ l)	UFC/mL <sup>1</sup>
T <sub>1</sub>	Plantas inoculadas com meio estéril	2 $\mu$ l	0
T <sub>2</sub>	Plantas inoculadas com <i>P. savastanoi</i>	2 $\mu$ l	10 <sup>4</sup>
T <sub>3</sub>	Plantas inoculadas Antagonista 1	2 $\mu$ l	10 <sup>4</sup>
T <sub>4</sub>	Plantas inoculadas <i>Pss</i> + Antagonista 1	2 $\mu$ l/cada	10 <sup>4</sup>
T <sub>5</sub>	Plantas inoculadas Antagonista 2	2 $\mu$ l	10 <sup>4</sup>
T <sub>6</sub>	Plantas inoculadas <i>Pss</i> + Antagonista 2	2 $\mu$ l/cada	10 <sup>4</sup>

<sup>1</sup>UFC Unidades Formadoras de Colônias/mililitro. **Fonte:** O autor

As placas contendo as culturas puras de cada bactéria foram repicadas para tubos tipo Falcons com 5 ml de meio de cultura LB líquido, e incubadas em agitação por um período de 24 horas a 25°C e 175 rpm, como sugerido por Vilasbôas(2009). As suspensões de cada isolado foram diluídas a absorvância de 0.5 e em seguida, 1mL da suspensão foi transferida para tubos tipo Falcons com 10mL de meio de cultura líquido, com o auxílio de uma micropipeta, chegando a uma concentração final de 10<sup>4</sup>UFC/mL. Em cada uma das plantas, realizou-se três incisões centrais longitudinais com cerca de 1 cm de comprimento e distanciadas por no mínimo 5cm e efetuou-se a inoculação de 2 $\mu$ l das suspensões de cada isolado diluído de acordo com os tratamentos descritos (Figura 2A). Após a inoculação dos biocontroladores e do patógeno, na parte aérea das plantas, estas foram acondicionadas em casa de vegetação (Figura 2B), onde realizou-se a nebulização das plantas a fim de propiciar microclima favorável para infecção dos microrganismos.

Figura 2 – Inoculação.

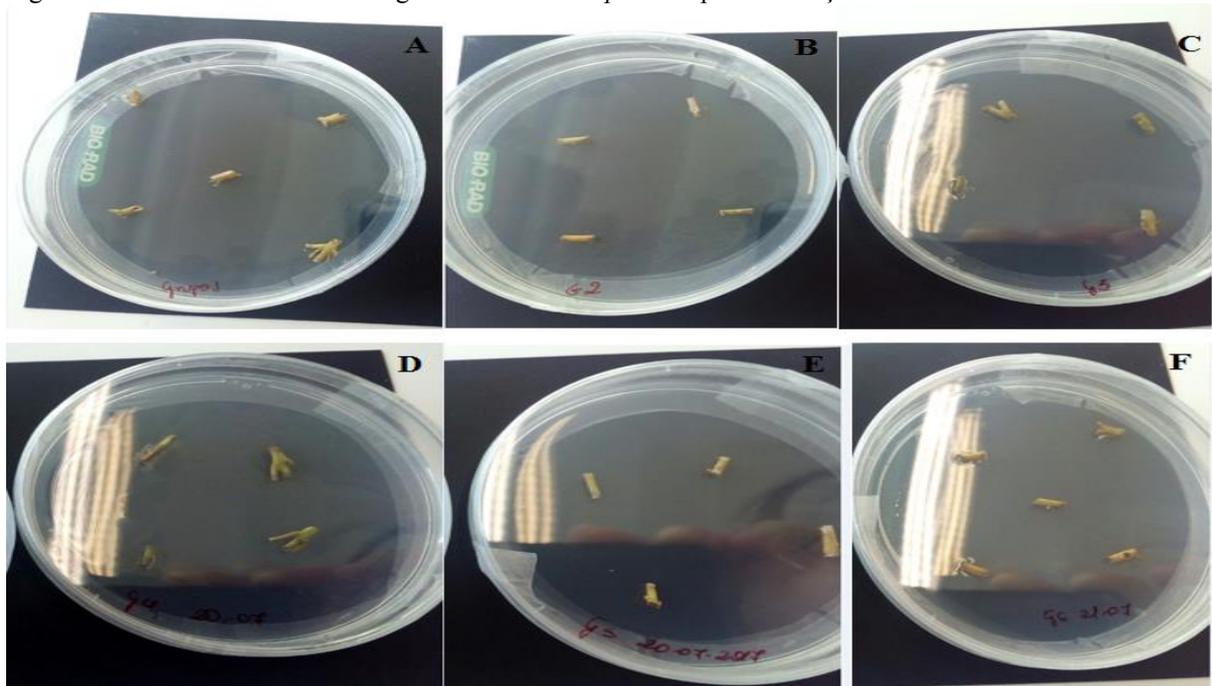


A) Detalhe da inoculação após incisão. B) Disposição dos tratamentos em casa de vegetação. **Fonte:** O autor.

Para avaliação da influência dos biocontroladores na diminuição da severidade da tuberculose em oliveiras, foi realizada uma avaliação 30 dias após a inoculação dos microrganismos nas plantas, sendo que o peso de massa fresca e seca de caule e raízes foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de significância utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

Decorridos 30 dias após a inoculação dos patógenos nas plantas, foram realizados os testes *in vitro*, fim de quantificar a possível presença de microrganismos endofíticos nos fragmentos de caule. Os tecidos foram desinfestados segundo Viana et al. (2008), com álcool a 70% durante dois minutos, hipoclorito de sódio a 1% durante três minutos, álcool a 70% durante um minuto e por fim com três lavagens consecutivas em água destilada esterilizada. Os fragmentos foram secos em papel de filtro esterilizado e transferidos para placas de Petri, contendo meio de cultura LB, em condições de assepsia as quais foram mantidas por 10 dias em temperatura ambiente.

Figura 3 - Isolamento dos tecidos vegetais de *Olea europaea* L após inoculação.



A-F: Tecidos vegetais dos respectivos tratamentos. Fonte: O autor.

Decorridos 10 dias após o acondicionamento das placas de Petri® contendo os segmentos dos tecidos vegetais das plantas, as amostras foram submetidas à análise de variância utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2003).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao realizar o teste de pareamento de culturas *in vitro*, observou-se que o crescimento das linhagens de *Bacillus* sp. e *Bacillus amyloliquefaciens* possuíam potencial antagônico contra o agente causal da tuberculose *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*. Observando-se os resultados das inoculações dos antagonistas *in vivo* em oliveira (*Olea europaea* L.) cultivar “Cobrançosa”, pelos atributos de massa seca de parte aérea e massa seca de raiz, nota-se que não há inibição do microrganismo teste. A dupla interação antagonista x *Pseudomonas* não demonstrou significância a 5% de probabilidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Resumo de análise de variância (ANOVA) das plantas após inoculação com antagonistas e *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

FV	GL	QM			
		MFC	MFR	MSC	MSR
<b>Antagonista</b>	2	11,78 <sup>ns</sup>	26,77 <sup>ns</sup>	4,34 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>
<i>Pseudomonas</i>	1	37,10 <sup>ns</sup>	8,68 <sup>ns</sup>	36,81*	4,62 <sup>ns</sup>
<b>Antagonista*<i>Pseudomonas</i></b>	2	3,57 <sup>ns</sup>	16,00 <sup>ns</sup>	0,33 <sup>ns</sup>	20,60 <sup>ns</sup>
<b>Erro</b>	24	29,00	34,02	7,99	12,26
<b>Total</b>	29				
<b>CV%</b>		28,55	34,13	23,87	37,63

CV = coeficiente de variação; <sup>ns</sup> não-significativo pelo teste Tukey a 5 %;

A massa seca do caule foi influenciada significativamente para o tratamento em que foi inoculado 2µl de *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* a 10<sup>4</sup> UFC/mL, o que não condiz com o padrão de normalidade do experimento, uma vez que, em decorrência das condições experimentais de temperatura que no período de 1 a 20 de junho, o valor médio da temperatura máxima do ar em Portugal continental foi de 31.2 °C, valor superior ao valor normal em 5.8 °C, o efeito dos tratamentos não pôde ser constatado, logo o resultado de aumento de massa seca do caule não foi devido a utilização da *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*.

Trapero e Blanco (2004) afirmam que a temperatura ótima para ocorrer infecção causada por *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* situa-se entre os 23 – 24°C, sendo que os períodos de infecção mais prováveis ocorrem no outono e na primavera, nas infecções de outono e inverno, o tumor não se produz até a primavera seguinte, enquanto nas infecções de primavera e princípio de verão, pode desenvolver-se de 10 a 14 dias após a inoculação. Isto faz com que estas infecções se tornem mais perigosas, sobretudo quando coincidem com temperaturas elevadas, chuvas e/ou umidade relativa superior a 80%, na presença de ferimentos.

Ratificando com Tortora et al. (2000), Oliveira (2006) concluiu que em cultivos realizados a 37°C, os tempos de cultivo sempre foram menores do que naqueles em que *Bacillus subtilis* foi mantido a 30°C. Em estudos realizados por Carvalho (2005) com *B. subtilis* R14, é relatado que valores de velocidade máxima de crescimento microbiano a 37°C é aproximadamente duas vezes maior que a 30°C, comprovando que a temperatura em que se encontra o microrganismo é um fator limitante.

Ressalta-se que embora os isolados no presente trabalho não terem obtido efetividade nas plantas inoculadas, diversos autores comprovam a eficiência do controle biológico utilizando microrganismos endofíticos, como Ludwig e Moura (2007) que avaliaram o efeito de oito isolados bacterianos de *Pseudomonas synxatha*, *Pseudomonas fluorescens* (DFs223), *P. fluorescens* DFs 306 (isolado de sementes de cebola), *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. e *Stenotrophomonas malthophilia* microbiolizados em sementes de arroz da cultivar “El Passo L144” para controle da queima-das-bainhas do arroz, causada por *Rhizoctonia solani*. No trabalho foram selecionados três isolados como promissores no biocontrole, *Pseudomonas synxatha*, *P. fluorescens* DFs 306 (isolado de sementes de cebola) com reduções na severidade da doença atingindo 50, 33,3 e 16,7%, respectivamente. Estes isolados foram utilizados nos ensaios posteriores, em casa de vegetação e conduzidos até o ponto de colheita, onde foi possível observar o efeito biocontrolador do isolado *P. fluorescens* (DFs223), com reduções significativas na severidade da doença chegando a 88 e 91,7% no segundo e terceiro ensaios respectivamente.

Santos et al. (2006), investigaram o potencial de controle biológico da bactéria *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, causadora da doença mancha aquosa em aveia, através da microbiolização das sementes com 4 isolados de *Bacillus* spp., que produziram compostos ativos quando testados *in vitro* contra o patógeno. Os resultados dos tratamentos de sementes previamente infectadas pela bactéria alvo com o líquido fermentado produzido pelas sementes inoculadas com *Bacillus* spp, permitiram avaliar a eficiência *in vivo* das quatro linhagens de *Bacillus* spp. no controle da mancha aquosa. Tendo como destaque o isolado *B. megaterium* pv. *cerealis* que reduziu a incidência da doença em 89% e a severidade da mancha aquosa em 92,7%.

O controle biológico da bactéria *Xantomonas axonopodis* pv. *phaseoli* causadora do crestamento bacteriano comum do feijoeiro foi avaliado com a utilização de quatro isolados bacterianos obtidos a partir de plantas de feijão e de outros hospedeiros, são esses: os isolados UFV-172 e UFV-75 de *Bacillus cereus* isolados do filoplano de um feijoeiro sadio, um isolado de *Pseudomonas putida* (UFV-053) obtido de rizosfera de uma planta de feijão sadia e

um isolado de *B. cereus* (UFV-101) isolado do filoplano de uma planta de tomate sadia. Plantas de feijoeiro cv. “Pérola” tiveram seu filoplano atomizado com as suspensões dos antagonistas e após 48 horas, as plantas foram inoculadas por atomização com uma suspensão da fitobactéria. Os quatro antagonistas independente da origem do isolamento reduziram a severidade do crestamento bacteriano em comparação com o controle (GARCIA et al. 2008).

Maketon et al. (2008) investigaram a capacidade de biocontrole de *Bacillus subtilis* e *Trichoderma harzianum*, sozinhos e em combinação, para três patógenos do fumo, *Ralstonia solanacearum*, *Pythium aphanidermatum* e *Cercospora nicotiana*, quando testados em combinação demonstraram capacidade de controle dessas doenças.

Outros autores ainda comprovam a capacidade de espécies do gênero *Bacillus* em promover o crescimento de plantas, podendo levar a uma rápida germinação da semente de uma espécie vegetal, como relata Manjula e Podile (2005) em sementes de feijão-guandu que quando tratadas com uma formulação à base de *B. subtilis*(AF-1) em turfa e suplementada com quitina, apresentaram aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%.

Sementes de algodão, milho e soja quando expostas ao tratamento com bioformulado à base de *B. subtilis* (PRBS1) também apresentaram incremento na emergência das plântulas. Com o rápido desenvolvimento das plântulas, as plantas alcançaram o estágio adulto mais cedo, e com isso permanecem menos tempo no campo, o que acarretar em um escape dos patógenos presentes no solo e no ambiente externo (ARAÚJO, 2008)

O sucesso da utilização de *B. subtilis* na promoção de crescimento de plantas está intrinsecamente relacionado com as características biológicas deste microrganismo, que apresenta facilidade de manter sua viabilidade em bioformulados. Assim, o potencial para o incremento da produtividade, bem como a redução de doenças, tem se tornado evidente para essa espécie (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

Os resultados das análises de avaliações da presença de bactérias endofíticas nos tecidos das amostras de plantas coletadas, não mostraram-se significativos quanto à presença de bactérias ( $p < 0,05$ ), conforme tabela 4, o que corrobora para a não formação de tumores nas plantas inoculadas com o patógeno.

Tabela 4 - Resumo de análise de variância (ANOVA) da avaliação da presença de bactérias endofíticas nos tecidos das amostras de plantas.

FV	GL	QM
<b>Tratamento</b>	5	0 <sup>ns</sup>
<b>Erro</b>	12	0 <sup>ns</sup>
<b>Total</b>	17	
<b>CV%</b>	0	

CV = coeficiente de variação; <sup>ns</sup> não-significativo pelo teste Tukey a 5 %.

Os candidatos a agentes de controle biológico e promotores de crescimento precisam, segundo Santoyo et al. (2012), reunir características como: crescimento rápido e colonização de diferentes ambientes, capacidade de competição, utilização de diferentes fontes de nutrientes, sobrevivência sob estresse, síntese de metabolitos com alta atividade antimicrobiana e, por fim, capacidade de promover crescimento em plantas. Desta forma, os isolados aqui utilizados, possuem potencial para serem explorados neste sentido, à medida que a avaliação do crescimento das bactérias em condições *in vivo* seja realizada em épocas em que as temperaturas oscilem entre 20-25°C.

## 5. CONCLUSÃO

Os agentes *Bacillus amyloliquefasciens* e *Bacillus* sp. de biocontrole a *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, apesar de terem sido eficientes em condições *in vitro*, quando inoculadas *in vivo* não possuíram efetividade devido provavelmente a alta temperatura média de 31.2 °C no período de avaliação em Portugal.

Os resultados obtidos neste trabalho deixam em aberto linhas para prosseguir a investigação e aplicação das estratégias apresentadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. **Plant pathology**. 5th edition, Elsevier, Academic Press, Londres, 922pp, 2005.
- ALCOBIA, M. D.; RIBEIRO, J. R. **Manual do Olival em Agricultura Biológica**. Terra Sã. Alijó. 111pp, 2001.
- ANDREWS J. H.; HARRIS R. F. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annu Rev Phytopathol.*, v. 38, p.145-180, 2000.
- ARAÚJO, F.F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**. v.32, p.456-462, 2008.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, J.; MARCCHERONI JR. W.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AND AZEVEDO, J.L. **Diversity of endophytic bacterial populations and the irinteraction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants**. Applied and Environmental Microbiology. 68(10): 4906-4914, 2002.
- BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. **El Cultivo Del Olivo**. 5ª edición. Ediciones Mundi-Prensa, 2004.
- BETTIOL, W. (Org.) **Controle biológico de doenças de plantas**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPDA, 388p, 1991.
- BRESSO, E.; TOGAWA, R.; HAMMOND-KOSACK, K.; URBAN, M.; MAIGRET, B.; MARTINS, N. F. **GPCRs from *Fusarium graminearum* detection, modelling and virtual screening-the search for new routes to control head blight disease**. BMC Bioinformatics, London, v. 17, n. 18, p. 39, Dec. 2016.
- BUTT, T.M.; HARRIS, J.G.; POWELL, K. **Microbial Biopesticides: The European Scene.**, In: **Biopesticides: use and delivery**. Hall, F.R, Menn, J.J. (eds), pp. 23-44, Humana Press. Totowa, 1999.
- CALVO, H.; MARCO, P.; BLANCO, D.; ORIA, R.; VENTURINI, M. E. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. **Food Microbiology**, Cambridge, v. 63, p. 101-110, May. 2017.
- CANTERO, F. A. **Enfermedades Y Plagas del Olivo**. 3ª ed. Riquelme Y Vargas Ediciones, S. L., Jaen, 646pp, 1997.
- CARVALHO, A. L. U. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Crescimento e produção de lipopeptídeos e esporos**. Recife, PE, PÓS-BIOTEC/UFPE, 2005.
- CAWOY, H; BETTIOL, W.; FICKERS, P.; ONGENA, M. *Bacillus*-Based Biological Control of Plant Diseases. **Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management**. Edited by Margarita Stoytcheva, ISBN 978-953-307-459-7, p. 532, 2011.

CLEMENTE, J. M.; CARDOSO, C. R.; VIEIRA, B. S. E.; DA MATA FLOR, I.; COSTA, R. L. Use of *Bacillus* spp. as growth promoter in carrot crop. **African Journal of Agricultural Research**, Nairóbi, v. 11, n. 35, p. 3355-3359, Sep. 2016.

COOK, R. J.; BACKER, K. F. The nature and practice of biological control of plant pathogens. 2. ed. **St. Paul: The American Phytopathological Society**, 539p, 1983.

DOVRAT, D.; AHARONI, A. **Bioengineering: Evolved to overcome Bt-toxin resistance**. Nature, London, v.1, n.1, p.1-2, Apr. 2016.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**: a folder Available on the internet. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/bacillus.html>> Acesso em 28 de agosto de 2017.

FERRAZ, V. **Processamento geral dos alimentos: Processamento do azeite**. Instituto Politécnico de Coimbra, Coimbra, 2010.

FERREIRA, D. F. **Programa Sisvar: sistema de análise de variância: versão 3.04**. Lavras: Edufla, 2003.

FISHER, M.M.; WILCOX, L.W.; AND GRAHAM, L.E. Molecular characterization of epiphytic bacterial communities on charophycean green algae. **Applied and Environmental Microbiology**. 64(11): 4384-4389, 1998.

FUENTES-RAMIREZ, L.E.; CABALLERO-MELLADO, J. **Bacterial biofertilizers**. In: **PGPR: Biocontrol and Biofertilization**. Siddiqui, Z.A. (eds), pp. 143-172, Springer. Dordrecht, 2006.

GABINETE DE PLANEJAMENTO, POLÍTICAS E ADMINISTRAÇÃO GERAL - GPP. **Ficha de Internacionalização: Azeite**. Lisboa, 2016.

GARCIA, A. G. **Nueva Olivicultura**. 4ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 2000.

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

GOMES, N. S. B.; GRIGOLETTI JUNIOR, A.; AUER, C. G. **Seleção de antagonistas para o controle de *Cylindrocladium spathulatum* em erva-mate**. Bol. Pesq. Fl., Colombo, n.43, p.123-138, 2001.

HALLMANN, J.; BERG, G.; AND SCHULZ, B. Isolation Procedures for Endophytic Microorganisms. In Schulz B., Boyle C., Sieber T.N. (Eds.) **Soil Biology**, 9: 299-319, 2006.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**. v. 43. p. 895-914, 1997.

INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. **Boletim do mercado**, 2016. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/news/view/697-year-2017-news/857-market-newsletter-june-2017>> Acesso em 18 de julho de 2017.

KLOEPPER, J. W.; MCINROY, J. A.; BOWEN, K. L. Comparative identification by fatty acid analysis of soil, rhizosphere, and geocarposphere bacteria of peanut (*Arachnishypogaea* L.). **Plant and Soil**, v. 139. p. 85-90, 1992.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Tropica – Ciências Agrárias e Biológicas**. V. 4, N. 2, p. 12, 2010.

LEÓN, M.; YARYURA, P. M.; MONTECCHIA, M. S.; HERNÁNDEZ, A. I.; CORREA, O. S.; PUCHEU, N. L.; GARCÍA, A. F. Antifungal activity of selected indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the soy bean rhizosphere. **International journal of microbiology**, v. 20, n.1, p. 1-10, Nov. 2009.

LOPES, J. I. **A Olivicultura na Região de Trás-os-Montes Percurso Profissional de 1989 a 2013**. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2015.

LU, X.; ZHOU, D.; CHEN, X.; ZHANG, J.; HUANG, H.; WEI, L. Isolation and characterization of *Bacillus altitudinis* JSCX-1 as a new potential biocontrol agent against *Phytophthora sojae* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Plant and Soil**, New York, v. 413, n. 1, p. 1-14, Feb. 2017.

LUDWIG, J.; MOURA, A. B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n. 5. p. 381-386. 2007.

LUO, J. Y.; ZHANG, S.; PENG, J.; ZHU, X. Z.; LV, L. M.; WANG, C. Y.; CUI, J. J. Effects of soil salinity on the expression of bt toxin (cry1ac) and the control efficiency of *Helicoverpa armigera* in field-grown transgenic bt cotton. **Plosone**, San Francisco, v. 12, n. 1, p. 1-13, Jan. 2017.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas Rapp**, Passo Fundo, v. 4. p. 1-49, 1996.

MADIGAN, M.; JOHN, M.; KELLY B.; DANIEL, B.; DAVID, S. **Microbiologia de Brock**, 14° ed. Porto Alegre: Artmed, 960 p, 2016.

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; AND SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**. 9(1): 250-258, 2010.

MAKETON, M.; APISITSANTIKUL, J.; SIRIRAWEEKUL, C. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* AP-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, p. 296-300, 2008.

MANJULA, K.; PODILE, A.R.. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARIANO, R. L. R et al.; **Biocontrole de doenças de plantas**. In: TORRES, J. B. & MICHEREFF, S. J. (Eds). **Desafios do manejo integrado de pragas e doenças**. Recife: UFRPE, p. 78-111, 2000.

- MELO, I. S. **Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos.** In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Controle Biológico*.v.1. Jaguariúna, SP: EMBRAPA, p. 17-67, 1998.
- MELO, I. S. **Trichoderma e Gliocladium como bioprotetores de plantas.** Revisão Anual de Patologia de Plantas Rapp, Passo Fundo, v.4. p. 261-295, 1996.
- MICHEREFF, S. J. **Fundamentos de fitopatologia.** Recife, Pernambuco, 2001.
- OLIVEIRA, F. H. P. C. **Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14 Crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos.** Recife, PE, PÓS-BIOTEC/UFPE, 2006.
- PALAZZINI, J. M.; DUNLAP, C. A.; BOWMAN, M. J.; CHULZE, S. N. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, London, v. 192, n. 1, p. 30-36, Nov. 2016.
- PIGGOT, P.; HILBERT, D. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 7, No. 6, pp. 579-586, 2004.
- PINTO, M. H; BATISTA, V; BALTAZAR. M. **Tuberculose ou ronha da oliveira (*Pseudomonas savastanoi*).** DRAPCentro - Divisão de Protecção e Qualidade da Produção,2013. Disponível em: <[http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/tuberculose\\_oliveira\\_2013.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/tuberculose_oliveira_2013.pdf)> Acesso em: 23 de abril de 2017.
- PROTA, U. **Le malattie dell'olivo e relativa difesa. Attidel convegnoL' Olivicoltura mediterrânea: stato e prospettive della coltura e della ricerca,** Rende (CS). 26-27-28 gennaio 1995: 451-471, 1995
- QIAO, Y.; LIU, L.; XIONG, Q.; FLORES, C.; WONG, J.; SHI, J.; ZHANG, F. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Naturegenetics*, London, v. 45, n. 3, p. 330-333, Feb. 2013.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias Fitopatogênicas.**Viçosa: UFV, 1995.
- SABARATNAM, S. & BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas syringae*pv. *Syringae* B728 and *Pantoea agglomerans* BRT98 in Epiphytic and Endophytic Colonization of Leaves. *Appliedand Environmental Microbiology*, vol. 69, n. 2, p. 1220-1228, 2003.
- SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M.D.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of Biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* And*Pseudomonas*: a review. *BiocontrolSciTechnol.* 22, 855-872, 2012.
- SANTOS, E. R.; GOUVEIA, E. R.; MARIANO, R. L. R.; SOUTOMAIOR, A. M. Controle biológico da mancha-aquosa do melão por compostos bioativos produzidos por *Bacillus* spp. *Summa Phytopathologica*, v.32, n.4. p.376-378, 2006.
- SARAMAGO, I. S. L. **Olival em modo de produção biológico.** Instituto Politécnico de Beja, Escola Superior Agrária, Portugal, 2009.

SENTHILKUMAR, M.; SWARNALAKSHMI, K.; GOVINDASAMY, V.; LEE, Y. K.; ANNAPURNA, K. Biocontrol potential of soybean bacterial endophytes against charcoal rot fungus, *Rhizoctonia bataticola*. **Current microbiology**, New York, v. 58, n. 4, p. 288-293, Apr. 2009.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Abingdon, v. 1, n. 1, p. 446-459, Apr. 2017.

SILVEIRA, E. B. **Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças**. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds). **Proteção de plantas na agricultura sustentável**. Recife: UFRPE, p. 71-100, 2001.

SOBRAL, J. K. **A comunidade endofítica e epifítica de soja (*Glycine Max*) e estudo da interação endofíticos planta**. Tese (Doutorado em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de plantas). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

TORRES, L. **Manual de proteção integrada do olival**. Projecto AGRO296, Protecção integrada da oliveira nas regiões de Trás-os-Montes e Beira Interior, 2007.

TORRES, M. J.; BRANDAN, C. P.; SABATÉ, D. C.; PETROSELLI, G.; ERRABALSELLS, R.; AUDISIO, M. C. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**, San Diego, v. 105, p. 93-99, Feb. 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6ed. Porto Alegre: Arte Médicas, 2000. 827p.

TRAPERO, A.; BLANCO, M. A. Enfermedades. In: BARRANCO, D. FERNANDEZ-ESCOBAR, R & RALLO, L. (Eds) El cultivo del olivo. 5ª Ed. Ediciones **Mundi-Prensa**, Madrid. 557 – 614, 2004.

VAN LOON, L. C.; BAKKER P. A. H. M.; PIETERSE C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. v.36, p. 453-483, 1998.

VIANA, M. G.; ALBUQUERQUE C. C. DE.; MEDEIROS, E.V. DE.; VIANA, F. A.; SILVA, K. M. B. **Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos *Senna alata* contra *Monospora scuscannonballus***. Ciênc. agrotec., Lavras, v. 32, n. 5, p. 1387-1393, set./out., 2008.

VILASBÔAS, F. DA S. **Seleção de biocontroladores de *Pseudomonas savastanoi*pv. *Glycinea* em soja**. Universidade De Passo Fundo, Passo Fundo, 2009.

WANG, J.; ZHANG, H.; WANG, H.; ZHAO, S.; ZUO, Y.; YANG, Y.; WU, Y. Function validation of cadherin as a receptor of Bt toxin Cry1Ac in *Helicoverpa armigera* utilizing the CRISPR/Cas9 system. **Insect biochemistry and molecular biology**, Amsterdam, v. 76, p. 11-17, Sep. 2016.