



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CAROLINE BERTOGLIO

**METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE *Xanthomonas citri*  
pv. *glycines* PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA  
RESISTENTES À PÚSTULA BACTERIANA**

---

Londrina  
2021

CAROLINE BERTOGLIO

**METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE *Xanthomonas citri*  
pv. *glycines* PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA  
RESISTENTES À PÚSTULA BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Balbi-Peña

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Neucimara Rodrigues Ribeiro

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B545m Bertoglio, Caroline.  
Metodologias de inoculação de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* para seleção de cultivares de soja resistentes à pústula bacteriana / Caroline Bertoglio. - Londrina, 2021.  
73 f. : il.

Orientador: Maria Isabel Balbi-Peña.  
Coorientador: Neucimara Rodrigues Ribeiro.  
Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Soja - Tese. 2. *Xanthomonas campestris* - Tese. 3. Inoculação - Tese. 4. Virulência (Microbiologia) - Tese. I. Balbi-Peña, Maria Isabel . II. Ribeiro, Neucimara Rodrigues . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDU 63

CAROLINE BERTOGLIO

**METODOLOGIAS DE INOCULAÇÃO DE *Xanthomonas citri*  
pv. *glycines* PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES DE SOJA  
RESISTENTES À PÚSTULA BACTERIANA**

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Balbi-Peña  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Rafaela Regina Moreira  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dr<sup>o</sup>. Rui Pereira Leite Jr.  
Instituto de Desenvolvimento Rural do Paraná –  
IDR – Paraná

Londrina, 26 de fevereiro de 2021.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família pelo apoio e a UEL pela oportunidade de realização do mestrado.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Balbi-Peña e à minha coorientadora Dr<sup>a</sup>. Neucimara Rodrigues Ribeiro, por serem guias neste processo.

Agradeço aos amigos que estiveram comigo e aos amigos que fiz durante este percurso. À minha amiga e companheira de apartamento Bruna, por podermos compartilhar durante esse período nossas angústias e conquistas. Agradeço à minha amiga Izabela, pela amizade desde o estágio, que com certeza levarei para sempre, e por sempre estar disposta a ajudar.

Agradeço aos amigos e colegas do IAPAR e aos amigos e colegas da GDM, em especial à Jana, pela amizade e por me passar todos seus conhecimentos. Agradeço ao Dr. Rui Pereira Leite Jr, por todo incentivo antes e durante o mestrado e pelas considerações na banca. Também agradeço à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Rafaela Moreira, pelas considerações e sugestões dadas na banca.

Agradeço também a todos os professores da pós-graduação da UEL, pelo empenho e pelo empenho em nos ensinar, posso afirmar que aprendi muito com vocês. E também sou grata à CAPES, pela bolsa concedida durante o mestrado.

Agradeço à todos que me ajudaram de forma direta e indireta, para que eu pudesse finalizar meu trabalho.

*Muito obrigada a todos, eu não conseguiria concluir sem a ajuda de vocês!*

***“Cabe ao homem compreender que o solo fértil onde tudo que se planta dá, pode secar. Que o chão que dá frutos e flores pode dar ervas daninhas. Que a caça se dispersa e a terra da fartura pode se transformar na terra da penúria e da destruição. O homem precisa entender que de sua boa convivência com a natureza depende sua subsistência e que a destruição da natureza é sua própria destruição, pois a sua essência é a natureza, a sua origem e o seu fim”***

*Elizabeth Jhin*

BERTOGLIO, CAROLINE. **Metodologias de inoculação de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* para seleção de cultivares de soja resistentes à pústula bacteriana.** 2020. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2021.

## RESUMO

A pústula bacteriana causada por *Xanthomonas citri* pv. *glycines* é considerada uma das mais sérias doenças bacterianas à nível global na cultura da soja. Os objetivos do estudo foram: testar diferentes condições de inoculação, avaliar diferentes métodos de inoculação artificial em casa-de-vegetação, determinar a agressividade e variabilidade patogênica de isolados da bactéria, propor um protocolo de inoculação artificial para *X. citri* pv. *glycines* visando o *screening* de genótipos de soja, e caracterizar cultivares comerciais de soja usando o protocolo proposto. Testaram-se três tempos de permanência em câmara úmida (12, 24 e 48 horas pré e pós-inoculação), três estádios fenológicos para inoculação (V2, V3 e V4 correspondentes a aproximadamente 15, 20 e 25 dias após semeadura-DAS) e duas concentrações de inóculo ( $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Os métodos de inoculação avaliados foram: agulhas múltiplas, tesoura, pincel e aspersão. Os genótipos avaliados foram NT12 2042 (S), VMax (MS), BMX Potência (MR) e BRS 316 (R). Avaliaram-se a severidade, o tipo de sintoma, o tempo de inoculação e o volume de inóculo necessário para cada método. A agressividade de cinco isolados de *X. citri* pv. *glycines* foi avaliada nos genótipos NT12 2042 (S), Peking (S), VMax (MS) e BRS 316 (R). Com os dados de severidade de seis avaliações, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença. A caracterização de resistência foi avaliada em 16 cultivares comerciais pelo método de aspersão e pelo método do pincel. As condições de inoculação mais adequadas foram inoculação no estágio V3 (20 DAS), com concentração de inóculo de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> e 24 horas de câmara úmida pré e pós inoculação. O método de aspersão foi o escolhido como o mais adequado, rápido e prático método para *screening* de genótipos de soja em programas de melhoramento. Os testes de agressividade mostraram diferença significativa entre os isolados, sendo os isolados 333, GDM 01 e GDM 02 os mais agressivos, enquanto os isolados 87-2 e GDM 03 foram os menos agressivos. Os ensaios de caracterização de cultivares mostraram diferenças nas reações de alguns cultivares quando inoculados com o método do pincel e com o método de aspersão, o que sugere que o método do pincel, superestima os sintomas da doença, não sendo o ideal para caracterizar cultivares para resistência à pústula bacteriana em programas de melhoramento.

**Palavras-chave:** *Glycine max*; protocolo de inoculação; virulência; *Xanthomonas axonopodis* pv; *glycines*.

BERTOGLIO, CAROLINE. **Inoculation methodology of *Xanthomonas citri* pv. *glycines* for screening of soybean cultivars resistance to bacterial pustule.** 2021. 74 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina. 2021.

## ABSTRACT

Bacterial pustule caused by *Xanthomonas citri* pv. *glycines* is considered one of the most serious bacterial diseases globally in soybean cultivation. The research objectives were: to test different inoculation conditions, to evaluate different methods of artificial inoculation in greenhouse, to determine the aggressiveness and pathogenic variability of bacterial isolates collected in different locations, to propose an artificial inoculation protocol of *X. citri* pv. *glycines* for screening soybean genotypes, and to characterize commercial soybean cultivars using the proposed protocol. Three wet chamber periods were tested (12, 24 and 48 hours before and after inoculation), three inoculation phenological stages (V2, V3 and V4 corresponding to approximately 15, 20 and 25 days after sowing-DAS) and two inoculum concentrations ( $10^6$  and  $10^8$  CFU/mL). The inoculation methods evaluated were: multiple needles, scissors, brush and spray in NT12 2042 (S), VMax (MS), BMX Power (MR) and BRS 316 (R) genotypes. Severity, symptom type, inoculation time and inoculum volume required for each method were evaluated. The aggressiveness of five *X. citri* pv. *glycines* isolates were evaluated in NT12 2042 (S), Peking (S), VMax (MS) and BRS 316 (R) genotypes. With severity data from six evaluations, the area under the disease progress curve was calculated. The resistance characterization was evaluated in 16 commercial cultivars using spray method and brush method. The most suitable inoculation conditions were inoculation at V3 stage (20 DAS), with inoculum concentration of  $10^8$  CFU/mL and 24 hours of wet chamber before and after inoculation. The spray method was chosen as the most appropriate, quick and practical method for screening soybean genotypes in breeding programs. The aggressiveness tests showed a significant difference between isolates, 333, GDM 01 and GDM 02 isolates showed most aggressiveness, while 87-2 and GDM 03 isolates were the least aggressive. The cultivar characterization tests showed differences in some cultivars reactions when inoculated with the brush method and with the spray method, which suggests that brush method overestimates the symptoms of the disease, not being ideal for cultivars resistance characterization to bacterial pustule in breeding programs.

**Key words:** *Glycine max*; inoculation protocol; virulence; *Xanthomonas axonopodis* pv; *glycines*.

## LISTA DA TABELAS

- Tabela 1** – Código, local e data de coleta e origem dos isolados *Xanthomonas citri* pv. *glycines* utilizados neste estudo.....29
- Tabela 2** – Cultivares de soja utilizadas para caracterização de resistência à pústula bacteriana e sua reação à doença de acordo com o registro da empresa detentora da cultivar .....36
- Tabela 3** – Severidade da pústula bacteriana (% de A.F.) em plantas do genótipo NT 12 2042 inoculadas com duas concentrações de inóculo de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* e três estádios fenológicos (dias após semeadura - DAS) com 12 horas de permanência em câmara úmida (pré e pós-inoculação) .....39
- Tabela 4** – Severidade da pústula bacteriana (% de A.F.) em plantas inoculadas com duas concentrações de inóculo de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* e três estádios fenológicos (dias após semeadura - DAS) com 24 horas de permanência em câmara úmida (pré e pós-inoculação) .....40
- Tabela 5** – Severidade da pústula bacteriana (% de A.F.) em plantas inoculadas com duas concentrações de inóculo de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* e três estádios fenológicos (dias após semeadura - DAS) com 48 horas de permanência em câmara úmida (pré e pós-inoculação) .....40
- Tabela 6** – Severidade de pústula bacteriana (% de A.F) em plantas de soja inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* em diferentes estádios fenológicos (dias após a semeadura- DAS) e diferentes tempos pré e pós-inoculação em câmara úmida (horas) .....41
- Tabela 7** – Severidade de pústula bacteriana em plantas de soja inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* isolado 333 para quatro diferentes métodos de inoculação.....44
- Tabela 8** – Tempo de execução e volume da suspensão bacteriana necessários para a inoculação de 60 plantas de soja com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* utilizando os métodos de inoculação tesoura, agulhas, pincel e aspersão..... 48

<b>Tabela 9</b> – Severidade de pústula bacteriana em genótipos NT 12 2042, Peking e Vmax RR inoculados pelo método de aspersão com cinco isolados de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>Glycines</i> em diferentes dias após inoculação (DAI) nos experimentos 1 e 2 .....	50
<b>Tabela 10</b> – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) nos genótipos NT 12 2042, Peking e Vmax RR inoculados pelo método de aspersão com cinco isolados de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i> nos experimentos 1 e 2 .....	54
<b>Tabela 11</b> – Caracterização da reação de cultivares em resposta à inoculação com o isolado 333 de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i> utilizando os métodos de aspersão e pincel em condições de casa-de-vegetação. Avaliação 16º dia após inoculação (DAI) .....	56

## LISTA DE FIGURAS

### 3 ARTIGO

- Figura 3** – Árvore filogenética com base na análise do gene 16S mostrando agrupamento dos isolados GDM 01, GDM 02, 333 e 87-2 com o patovar *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* acesso KM593178.....38
- Figura 1** – Severidade de pústula bacteriana aos 15 dias após a inoculação nos genótipos de soja suscetível (A) NT 12 2042 e resistente (B) BRS 316 RR inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* usando quatro diferentes métodos.....46
- Figura 2** – Injúrias causadas nas folhas pelos diferentes métodos de inoculação nos tratamentos controle de cada método utilizando água estéril: (A) agulhas; (B) pincel; (C) tesoura e (D) aspersão.....47
- Figura 4** – Curva de progresso da doença para os diferentes isolados de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* avaliados durante 19 dias e inoculados pelo método de aspersão nos genótipos (A) NT 12 2042, (B) Peking, (C) Vmax RR e (D) Vmax RR com escala do eixo y modificada (máximo de 4% de severidade) no experimento 1.....52
- Figura 5** – Curva de progresso da doença para os diferentes isolados de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* avaliados durante 19 dias e inoculados pelo método de aspersão nos genótipos (A) NT 12 2042, (B) Peking, (C) Vmax RR e (D) Vmax RR com escala do eixo y modificada (máximo de 4% de severidade) no experimento 2.....53
- Figura 3** – Comparação das reações dos genótipos BR-4, Desafio RR e NT 12 2042 (padrão suscetível) inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* pelos métodos de pincel e aspersão. Figura (A) Cultivar BR-4 inoculada pelo método do pincel, (B) Cultivar BR-4 inoculada pelo método de aspersão, (C) Cultivar Desafio RR inoculada pelo método do pincel, (D) Cultivar Desafio RR inoculada pelo método de aspersão, (E) NT 12 2042 inoculada pelo método do pincel e (F) NT 12 2042 inoculada pelo método de aspersão.....57

#### **4 PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE *Xanthomonas citri* pv. *glycines* PARA SCREENING DE GENÓTIPOS DE SOJA EM CASA DE VEGETAÇÃO**

- Figura 4** – Sintomas característicos de pústula bacteriana causada por *Xanthomonas citri* pv. *glycines* em plantas de soja inoculadas artificialmente pelo método de aspersão. (A) folha com sintomas característicos em casa de vegetação na face adaxial do folíolo, (B) pústulas bacterianas na face abaxial do folíolo e (C) visualização em lupa das pústulas bacterianas na face abaxial do folíolo. ....61
- Figura 5** – Colônias características de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* crescidas em meio Ágar Nutriente por 48 horas a 28°C.....63
- Figura 6** – Detalhes do local da realização do experimento, material utilizado e sintomas da doença no momento da avaliação. (A) casa de vegetação com condições controladas de temperatura e umidade relativa, com detalhe para a utilização de aspersores os quais mantém a umidade em aproximadamente 80%; (B) plantas dentro de bandejas as quais são cobertas com lona plástica transparente; (C) inoculação por aspersão; (D) borrifador utilizado para inoculação por aspersão; (E) sintomas de pústula bacteriana no padrão suscetível sugerido (Peking) aos 15 dias após inoculação na face abaxial; e (F) na face adaxial da folha. ....65

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	CULTURA DA SOJA .....	13
2.1.1	Origem.....	13
2.1.2	Importância Econômica .....	14
2.2	PÚSTULA BACTERIANA.....	15
2.2.1	Importância.....	15
2.2.2	Etiologia E Sintomatologia.....	15
2.2.3	Epidemiologia .....	16
2.2.4	Fatores De Virulência .....	17
2.3	MÉTODOS DE INOCULAÇÃO.....	17
2.4	CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO .....	19
2.4.1	Concentração De Inóculo .....	19
2.4.2	Estádio Fenológico .....	20
2.4.3	Câmara Úmida.....	21
2.5	RESISTÊNCIA DE CULTIVARES.....	22
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	24
3.1	RESUMO.....	24
3.2	ABSTRACT .....	25
3.3	INTRODUÇÃO .....	26
3.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.4.1	Patógeno E Material Vegetal .....	29
3.4.2	Identificação Molecular Dos Isolados .....	30
3.4.3	Ajuste Das Condições De Inoculação: Tempo De Câmara Úmida, Concentração De Inóculo E Estádio Fenológico.....	31
3.4.4	Métodos De Inoculação De <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i> .....	32
3.4.5	Agressividade Dos Isolados.....	35
3.4.6	Caracterização da Resistência de Cultivares à Pústula Bacteriana .....	36
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
3.5.1	Identificação Molecular .....	37

3.5.1	Ajuste das Condições de Inoculação: Tempo de Câmara Úmida, Concentração de Inóculo e Estádio Fenológico.....	38
3.5.2	Métodos De Inoculação .....	43
3.5.3	Agressividade De Isolados .....	49
3.5.4	Caracterização de Cultivares.....	55
3.6	CONCLUSÕES GERAIS .....	59
<b>4</b>	<b>PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>glycines</i> PARA SCREENING DE GENÓTIPOS DE SOJA EM CASA DE VEGETAÇÃO .....</b>	<b>61</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	61
4.2	METODOLOGIA .....	62
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pústula bacteriana da soja, causada por *Xanthomonas citri* pathovar (pv) *glycines* (Nakano 1919) Constantin et al. 2016 (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), é considerada uma das principais doenças bacterianas da cultura da soja. A doença encontra-se disseminada por praticamente todas as grandes regiões produtoras de soja do Brasil, Estados Unidos, China e Índia, podendo causar grandes perdas em cultivares suscetíveis.

O patógeno sobrevive nos restos culturais e é transmissível por sementes. Seu modo de infecção é através de aberturas naturais ou ferimentos, provocando a hipertrofia das células. Os sintomas aparecem geralmente nas folhas, formando manchas de coloração parda, arredondadas e nunca angulares. No centro da lesão, forma-se uma pústula com pequena elevação, o que dá nome à doença.

Devido à importância da doença, em termos de incidência e severidade, busca-se cada vez mais, através do melhoramento genético, genótipos de soja resistentes. A busca por fontes de resistência se faz necessária, uma vez que o cultivo de genótipos suscetíveis de soja em grandes áreas pode resultar em epidemias de pústula bacteriana.

Entre as exigências da Lei de Proteção de Cultivares, para se obter a proteção de uma cultivar, é necessário a comprovação de características de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) da mesma. Sendo assim, para realização dos ensaios de DHE que envolvem a caracterização de resistência à doenças, a escolha do método de inoculação do patógeno é de extrema importância. São necessários métodos práticos, ágeis, de baixo custo, com boa eficiência em casa-de-vegetação e que tenham correlação com o comportamento das cultivares no campo com ocorrência natural da doença.

No caso da pústula bacteriana, tem-se verificado diferença entre o nível de resistência descrita no registro da cultivar e o comportamento observado em campo frente à pústula bacteriana. Tem se observado que o método de inoculação de *X. citri* pv. *glycines* proposto para caracterização de cultivares nos ensaios de DHE é agressivo, caracterizando cultivares com níveis de resistência menores aos observados em campo em condições de ocorrência natural da pústula bacteriana.

Em programas de melhoramento, métodos de *screening* em ambiente controlado são necessários para identificar cultivares de soja resistentes à pústula bacteriana. Com este objetivo, a severidade da doença em cultivares de soja com inoculação artificial em casa de vegetação deve-se correlacionar com a obtida em campo sob condições de ocorrência natural.

Com base no exposto, o estudo teve como objetivos: a) testar diferentes condições de inoculação (diferentes concentrações de inóculo, idades da planta no momento da inoculação e períodos de permanência das plantas em câmara úmida); b) avaliar diferentes métodos de inoculação artificial em casa-de-vegetação; c) propor um protocolo de inoculação artificial de *X. citri* pv. *glycines* para *screening* de genótipos de soja; d) determinar a agressividade e variabilidade patogênica de isolados da bactéria coletados em diferentes localidades; e e) caracterizar cultivares comerciais de soja usando o protocolo proposto para comparar com a reação que consta no registro destas cultivares.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 CULTURA DA SOJA**

#### **2.1.1 Origem**

A soja cultivada (*Glycine max* (L.) Merrill) é originária do leste asiático, conhecida como região da Manchúria (HYMOWITZ, 1970). Chegou no Brasil por volta de 1882, quando D'Utra fez o primeiro relato da soja no país. No entanto, as cultivares introduzidas não apresentaram boa adaptação (SEDIYAMA et al., 2009).

Em 1908 a leguminosa foi introduzida em São Paulo e nesse Estado demonstrou melhor desenvolvimento que na Bahia (SEDIYAMA et al., 2009). Todavia, foi no Rio Grande do Sul que a soja se adaptou melhor às condições climáticas, uma vez que estas eram similares às da região de origem. Diversos fatores contribuíram com a dispersão da cultura por todo o país, como investimentos em pesquisas de fertilidade do solo e implantação dos programas de melhoramento genético (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015).

Outros fatores tiveram sua importância e contribuíram para a expansão da soja, sendo eles: o aquecimento do mercado internacional na década de 1970 que avançou para o mercado interno; estabelecimento do parque industrial de processamento de soja, máquinas agrícolas e insumos; organização de redes de pesquisa nos setores público e privado; baixo valor da terra devido à ampliação da fronteira agrícola; topografia plana dos solos do cerrado; desenvolvimento de tecnologias para produção em baixas latitudes e políticas governamentais (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015).

### 2.1.2 Importância Econômica

A cultura da soja vem ganhando cada vez mais importância na agricultura mundial. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos – USDA – a área plantada no mundo em 2018 foi de 124,580 milhões de hectares com uma produção de 336,699 milhões de toneladas (USDA, 2018).

No Brasil, cerca de 36,949 milhões de hectares são cultivados com soja atualmente, com uma produção na safra 2019/2020 de 120.936,4 milhões de toneladas. Os maiores estados produtores brasileiros são Mato Grosso, Paraná e Goiás, respectivamente (CONAB, 2020).

Para gerar maior potencial de produção, foram criados os primeiros programas de melhoramento de soja por volta da década de 70. Inicialmente, o objetivo do melhoramento era basicamente o rendimento de grãos, com foco em características como altura de plantas e ciclo dos cultivares. A partir de década de 1980, o aparecimento, principalmente de doenças, modificou este foco (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015).

Estima-se que 15 a 20% das perdas ocorridas na cultura sejam devido ao ataque de fitopatógenos (HENNING et al., 2009). No Brasil, cerca de 46 doenças já foram relatadas na cultura, sendo causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus (EMBRAPA, 2011). No entanto, tais números tendem a aumentar devido a expansão da soja para novas áreas (SEDIYAMA; SILVA; BORÉM, 2015).

São listadas como as principais doenças bacterianas na cultura da soja o crestamento bacteriano (causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*), a pústula bacteriana (causada por *Xanthomonas citri* pv. *glycines*) e o fogo selvagem (causado por *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (ITO, 2013)

## 2.2 PÚSTULA BACTERIANA

### 2.2.1 Importância

A pústula bacteriana causada por *Xanthomonas citri* pv. *glycines* (Nakano 1919) Constantin et al. 2016 (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), pode causar, em condições de alta incidência e severidade, perdas na produtividade de até 37%, sendo a maior parte atribuída à infecção cotiledonar (SAIN; GOUR, 2013). De acordo com Ferreira et al. (1979) há registros de perdas de até 12% em lavouras nos Estados Unidos. Na Índia, já foi relatada aproximadamente 40% de redução no rendimento da cultura por causa desta doença (SHARMA; NAIR; PAWAR, 1993) e na Tailândia é considerada uma das principais doenças bacterianas da soja (KAEWNUM et al., 2005).

No Brasil, estudos de monitoramento feitos por Bonaldo, Riedo e Lima (2009) em 16 municípios no Paraná, mostraram a incidência da doença em 15,01% dos locais analisados.

### 2.2.2 Etiologia e Sintomatologia

*Xanthomonas citri* pv. *glycines* pertence ao filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Xanthomonadales*, família *Xanthomonadaceae* (NCBI, 2019).

É uma bactéria gram-negativa, com célula na forma de bastonete reto, de tamanho entre 0,4-0,6 x 0,8-2,0 µm, móvel por um único flagelo polar e aeróbica obrigatória (BEDENDO; BELASQUE, 2018).

Os sintomas da pústula bacteriana da soja são típicos das folhas, sendo caracterizados por manchas que possuem coloração parda, com formato arredondado e nunca angulares. No centro da lesão, observa-se uma pequena elevação, chamada de pústula, que dá nome à doença (GODOY et al., 2014). Essas pústulas geralmente ocorrem na parte inferior da folha (JONES; FETT, 1987).

As lesões formadas são circundadas por um estreito halo amarelo, que pode aumentar em lesões mais velhas. Com a evolução da doença no limbo foliar, as manchas aumentam de tamanho. Em ataques mais severos, o número de lesões aumenta, as quais coalescem e tornam a superfície da folha quase

totalmente necrosada (FERREIRA; LEHAM; ALMEIDA, 1979). Em cultivares suscetíveis, o grande número de pústulas na superfície da folha confere aparência áspera, à vista e ao tato (GODOY et al., 2014).

Os sintomas da pústula bacteriana são semelhantes aos observados para o crestamento, o que pode gerar confusão no momento de diagnose (FERREIRA; LEHAM; ALMEIDA, 1979), principalmente em estádios mais avançados e quando é realizada somente com base nos sintomas (GODOY et al., 2014). Ambas as doenças de origem bacteriana podem ser diferenciadas pela elevação no centro da lesão, característica da pústula e ausente no crestamento. Outro fator de diferenciação entre elas está relacionado ao aspecto das lesões necróticas, as quais têm contornos arredondados, não apresentam brilho e são pardas no caso da pústula bacteriana, enquanto que as lesões necróticas do crestamento bacteriano apresentam contornos angulares, coloração pardo-escura a negra, com brilho na face inferior (KIMATI et al., 1997).

Assim como outras bactérias fitopatogênicas, *X. citri* pv. *glycines* disponibiliza nas células do hospedeiro efetores de proteínas, que ajudam na colonização e contribuem para o desenvolvimento da doença (CARPENTER et al., 2019).

### 2.2.3 Epidemiologia

O patógeno é transmissível pelas sementes, não apresentando diferença visível entre as sadias e as infectadas. A sobrevivência na semente pode variar de 6 a 7 meses, o qual coincide com o período de processamento e armazenamento. Além do inóculo inicial, as sementes constituem um importante modo de disseminação à longa distância, podendo introduzir o patógeno em novas áreas onde ainda não estava presente (DANELLI; BIANCHIN, 2012). Os restos infectados de cultura são outra fonte de inóculo para as plantas jovens mantendo a bactéria viável na própria área de cultivo. Estes dois processos dão origem às infecções primárias (FERREIRA; LEHAM; ALMEIDA, 1979).

A bactéria infecta as plantas por meio de aberturas naturais ou ferimentos. Após a infecção, ocorre a multiplicação nas câmaras subestomáticas e

nos espaços intercelulares do mesófilo (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; LINDOW, 2016) ocasionando hipertrofia das células do hospedeiro

Em relação às infecções secundárias, estas são favorecidas por chuva e vento, sob condições de alta umidade e temperatura, transportando a bactéria de plantas doentes para sadias (HENNING et al., 2014). As gotas de chuva removem as células bacterianas da folha e as carregam para outras plantas a curtas distâncias (DANELLI; BIANCHIN, 2012).

#### 2.2.4 Fatores De Virulência

A virulência de *X. citri* pv. *glycines* está associada a diferentes determinantes genéticos, incluindo genes de patogenicidade como *hrp*, *hrc* e *hpa* que são regulados por *HrpG* e *HrpX*. Esse agrupamento inclui genes que compõem um sistema de secreção de tipo III, essencial para a patogênese, indução de uma reação hipersensível (HR) em algumas espécies de plantas e responsável por secretar efetores como o *avrXg1* dentro da célula hospedeira (ATHINUWAT et al., 2009)

Vários fatores de virulência de *X. citri* pv. *glycines* têm sido descritos, incluindo as exoenzimas celulase, protease, endo- $\beta$ -1,4-mannanase e pectatolases, além dos fatores de virulência secretados como ácido indol acético e citocinina (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; LINDOW, 2016).

A virulência diferencial expressa por *X. citri* pv. *glycines* em cultivares de soja é determinada pelo gene *avrBs3* homólogo ao *avrXg1*, gene de avirulência que confere resistência gene-a-gene (ATHINUWAT et al., 2009).

#### 2.3 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

O desenvolvimento eficiente de metodologias de inoculação consiste numa importante etapa na seleção de genótipos superiores em programas de melhoramento (SIVIERO et al., 2002).

Vários métodos são descritos para a inoculação de bactérias fitopatogênicas, podendo-se citar a atomização com pressão, infiltração, inoculação com o uso de abrasivos, aspersão com ou sem ferimentos, enxertia, entre outros

(ROMEIRO, 2001). Na fitobacteriologia, estudos de etiologia, epidemiologia e controle requerem métodos de inoculação eficientes, práticos, de baixo custo e que tenham reprodutibilidade em casa-de-vegetação e campo (HENZ; TAKATSU; REIFSCHNEIDER, 1988).

Um bom método de inoculação deve levar em consideração alguns critérios, como a boa discriminação entre genótipos resistentes e suscetíveis, repetibilidade, rapidez e uniformidade nos resultados, além de fácil execução (PASTOR-CORRALES; BEEBE; CORREA, 1981), provendo que a reação à infecção possa ser avaliada quantitativamente (ANDRUS, 1948).

Em trabalhos envolvendo a espécie *Xanthomonas axonopodis*, Nociti et al., (2006), utilizaram o método de perfuração com agulhas com imersão de folhas na suspensão de inóculo para a avaliação da agressividade de *X. axonopodis* pv. *aurantifolli* em limeira. O método de agulhas múltiplas para inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foi utilizado por Torres (2001) em plantas de feijoeiro. Também para inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, Andrade et al., (2017) utilizou o método de inoculação com tesoura, consistindo em dois cortes de 2 cm por folíolo, feitos com tesoura previamente imersa em suspensão bacteriana.

Estudos abrangendo a pústula bacteriana da soja mostram diferentes métodos de inoculação. Prathuangwong e Amnuakit (1987) utilizaram a inoculação artificial por aspersão em estudo de resistência e taxas de expressão da pústula bacteriana em diferentes cultivares. Groth et al. (1983) inocularam a bactéria por aspersão na face abaxial das folhas até encharcamento. Khaeruni et al. (2018) em estudo de indução de resistência, utilizaram o método de inoculação por aspersão em casa de vegetação. Soares e Arias (2016) sugerem o método de pincel com cerdas cortadas para inocular *X. citri* pv. *glycines* para estudos em casa de vegetação e o método de pulverização em experimentos de campo.

O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no ano de 2007, em publicação das instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja, propõem o método de inoculação de *X. citri* pv. *glycines* com pincel para determinação da reação de cultivares à pústula bacteriana em ensaios de casa de vegetação (MAPA, 2007). O método de inoculação com pincel consiste no uso de um pincel com cerdas cortadas embebido em suspensão bacteriana na concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, aplicado na superfície abaxial da folha (SOARES; ARIAS, 2016).

## 2.4 CONDIÇÕES DE INOCULAÇÃO

A determinação prévia das condições favoráveis para o estabelecimento da doença visando à infecção e colonização é importante para o estabelecimento de medidas de controle, que visam em última análise, desfavorecer o patógeno em quaisquer fases do estabelecimento da doença (AGRIOS, 2004). Além disso, é uma forma que visa obter os sintomas da doença artificialmente de modo viável para sua avaliação em estudos fitopatológicos que envolvem, por exemplo, curva de progresso da doença, caracterização de resistência de cultivares, avaliação de área foliar afetada, entre outros.

Diferentes intensidades da doença podem ser geradas com diferentes temperaturas, distintas concentrações de inóculo, diferentes durações de período de molhamento foliar, variação da agressividade ou virulência de isolados e nível de resistência de cultivares (SUTTON, 1998; ZADOKS; SCHEIN, 1979).

### 2.4.1 Concentração de Inóculo

Na área da fitopatologia ocorrem rotineiramente inúmeros trabalhos com inoculação artificial de bactérias, visando reproduzir os sintomas da doença. Nestes trabalhos com inoculação artificial é necessária a determinação da melhor concentração de inóculo e, que leve a resultados reproduzíveis (FERNANDES et al., 1991). Muitos trabalhos já foram desenvolvidos com a finalidade de determinar a melhor concentração de inóculo em diversos outros patossistemas (CAMERA; DEUNER; REIS, 2012; BORGES NETO; GORGATI; PITELLI, 2004; BORGES; RESENDE; VON PINHO, 2001).

No estudo realizado por Silveira et al. (2003) avaliou-se a severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo ( $3,4 \times 10^1$  a  $3,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. Os resultados indicaram que com o incremento da concentração de inóculo de *A. avenae* subsp. *citrulli*, o índice de doença aumentou em 60% na concentração de  $3,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> em comparação com a menor concentração ( $3,4 \times 10^1$  UFC mL<sup>-1</sup>).

Ochola et al. (2014) estudaram os efeitos interativos entre concentração de fertilizante e concentração de inóculo no desenvolvimento subsequente da murcha de *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* em bananeira pelo método de inoculação por injeção com seringa no pecíolo das folhas. Curiosamente, houve um efeito dominante altamente significativo da concentração de inóculo na capacidade do fertilizante em reduzir o índice de severidade da murcha e a mortalidade na bananeira. Ou seja, a carga bacteriana anulou o efeito do fertilizante na redução da doença em concentrações de  $10^6$  a  $10^{12}$  UFC mL<sup>-1</sup>. Essas concentrações desenvolveram o dobro de doença em comparação com as inoculações com concentrações de  $10^4$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Grande parte dos trabalhos que envolvem a inoculação artificial da bactéria fitopatogênica *X. citri* pv. *glycines* em casa de vegetação utilizam uma concentração da suspensão bacteriana de aproximadamente  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (PRATHUANGWONG; KHANDEJ, 1998; ATHINUWAT et al., 2009; ATHINUWAT et al., 2018). No entanto, outras concentrações também são utilizadas, por exemplo  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (SAIN, 2010) e  $10^{10}$  UFC mL<sup>-1</sup> (KHAERUNI et al., 2018).

#### 2.4.2 Estádio Fenológico

Trabalhos mostram que a resposta de plantas hospedeiras aos patógenos geralmente depende do estágio de desenvolvimento do hospedeiro (KENDRICK JR, 1948; SHARABANI et al., 2013)

No caso da resistência da batata à *Phytophthora infestans*, pesquisas sugerem que plantas no começo do florescimento são mais resistentes do que plantas mais jovens ou mais velhas em relação à esse estágio (CARNEGIE; COLHOUN, 1982).

Na soja, foi relatado que a severidade da ferrugem asiática aumenta no final da estação de crescimento à medida que as plantas amadurecem. Young et al. (2011) relataram que as plantas de soja nos estádios de crescimento R4 e R5 no norte da Flórida eram mais suscetíveis à ferrugem do que as plantas mais jovens.

Um estudo realizado por Neves et al. (2014) avaliou o estabelecimento e desenvolvimento da queima bacteriana causada por *X. axonopodis* em eucalipto em diferentes idades da folha, temperaturas e durações de

umidade. Os autores sugerem que a idade das folhas no momento da inoculação afetou significativamente a colonização e o desenvolvimento de sintomas causados pela bactéria. Aos 20 dias após inoculação, as folhas mais velhas apresentaram maior porcentagem de área foliar com lesões e colonização bacteriana. A severidade média nas folhas mais velhas foi de 17%, enquanto a média nas folhas novas e intermediárias foi de 0,2 e 1,7%, respectivamente.

#### 2.4.3 Câmara Úmida

As bactérias causadoras de doenças em plantas, diferentemente dos fungos, não possuem estruturas que permitam a penetração ativa nos tecidos vegetais do hospedeiro. Conseqüentemente, fitobactérias não possuem a capacidade de exercer força mecânica ou física para vencer barreiras como a da parede celular e a pressão de turgor da planta, e, por conseqüência penetrar em células epidérmicas intactas (GOODMAN, 1986). Diante disso, a grande maioria das bactérias causadoras de doenças foliares penetra na planta apenas por ferimentos e/ou aberturas naturais como os estômatos e hidatódios. Quando a umidade relativa do ar está baixa, os estômatos se fecham para evitar a transpiração e assim, a perda de água (REIS; OLIVARES, 2006), impedindo desta forma, que as bactérias adentrem no tecido vegetal. Desta maneira, reafirma-se a importância de utilização de câmara úmida pré e pós inoculação em estudos que envolvem a inoculação artificial de bactérias nas folhas de plantas. Este artifício proporciona maior umidade e molhamento foliar e conseqüentemente otimiza a penetração do patógeno nos tecidos vegetais pelas aberturas naturais e o desenvolvimento inicial da infecção.

Silveira et al. (2004) analisaram o efeito de vários fatores na severidade da mancha-aquosa (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) em frutos de melão do tipo Amarelo, como temperatura (15, 20, 25, 30, 35 e 40 °C), umidade (0 e 6 horas em câmara úmida) e concentração de inóculo ( $3,4 \times 10^1$  até  $3,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>), utilizando o método de inoculação de seringa, injetando a suspensão abaixo da superfície da casca. Os resultados em relação à umidade mostraram maiores diâmetros de lesões externas nos frutos mantidos em câmara úmida durante 6 horas tendo valores de 19,5 mm, e para plantas sem câmara úmida, os valores de diâmetro foram de 15,3 mm. Os autores concluíram que as epidemias da mancha-aquosa do melão são mais influenciadas por diferenças na temperatura, uma vez

que a presença da umidade não é essencial para o início da infecção, embora possa favorecer a maior severidade da doença.

Para inoculação de *X. citri* pv. *glycines* em soja, Sain e Gour (2013) em seu trabalho envolvendo a caracterização patológica e físico-bioquímica da bactéria, mantiveram as plantas em câmara úmida 24 horas antes da inoculação para permitir a abertura dos estômatos e criar alta umidade intercelular nos tecidos ao redor das aberturas naturais. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 48 h. Khaeruni et al. (2018) em estudo de indução de resistência à *X. citri* pv. *glycines* por rizobactérias, utilizaram câmara úmida somente após a inoculação, deixando as plantas por 24 horas sob condições de alta umidade.

## 2.5 RESISTÊNCIA DE CULTIVARES

Dependendo do local e das condições climáticas, as perdas econômicas devido à pústula bacteriana podem-se tornar devastadoras (LAVIOLETTE et al., 1970). Devido a isso, a incorporação de resistência em cultivares torna-se um dos métodos de controle mais eficientes.

Hartwig e Lehman (1951) e Feaster (1951) inicialmente constataram que a resistência de soja à *X. citri* pv. *glycines* pode ser conferida por apenas um gene recessivo, denominado *rxp*, identificado com base no cruzamento do genótipo CNS (resistente) com genótipos suscetíveis. Posteriormente, Manjaya e Pawar (1999), cruzando a cultivar P-4-2 (resistente) com a cultivar Monetta (suscetível), relataram a presença de genes recessivos duplicados, observando o padrão de segregação de 15 plantas suscetíveis para uma resistente. Os autores relataram a presença de dois genes de resistência recessivos que conferem alto nível de resistência à pústula bacteriana.

O fenótipo de resistência à pústula bacteriana é resultado do reconhecimento dos genes de avirulência (*avr*) da bactéria pelo hospedeiro, com simultânea expressão do gene R, sendo freqüentemente associado à uma resposta de hipersensibilidade (ATHINUWAT et al., 2018). Cultivares resistentes devido à presença do gene *rxp* apresentam menor intensidade de sintomas com maior concentração de inóculo, classificando essa resistência como parcial, uma vez que o gene *rxp* não restringe o crescimento total do patógeno (KIM et al., 2011).

No entanto, segundo Wrather et al. (2006), o uso do gene *rxp* não tem sido eficiente em reduzir perdas devido à doença na produtividade da soja. Han et al. (2007), em estudo comparando o crescimento bacteriano de *X. citri* pv. *glycines* nas cultivares PI 96188, CNS (resistente) e a Jinjoo (suscetível), descreveram diferentes reações de resistência frente à doença expressa na cultivar PI 96188, pois a mesma apresentou resposta atípica para todas as raças testadas. A cultivar apresentou sintomas de necrose sem halos cloróticos na parte correspondente aos sintomas necróticos da outra face das folhas, o conteúdo de clorofila nas folhas permaneceu inalterado até 12 dias após a infecção e ainda tinham cloroplastos intactos em comparação com as da cultivar suscetível. Os autores propuseram que o novo sintoma necrótico em PI96188 constituía um tipo de resposta resistente diferente de uma resposta hipersensível típica nos genótipos resistentes. Kim e colaboradores (2011) descrevem que a característica de resistência expressa na cultivar PI 96188 é condicionada por um novo gene ainda não descrito, com possibilidade de uma nova fonte de resistência.

No Brasil, grande parte das cultivares comerciais apresentam resistência à pústula bacteriana (LANNA FILHO, 2015), sendo este o único controle efetivo em áreas com presença do patógeno (VIOLATTI; TEBALDI, 2016). Porém, Soares e Arias (2016) em levantamento de linhagens de soja com resistência à doenças observaram o decréscimo do número de cultivares resistentes à pústula bacteriana a partir de 2011. Um dos fatores levado em consideração é que devido à durabilidade e à simplicidade do uso do gene *rxp* não tem havido buscas de outras fontes de resistência para a doença (VERNETTI; VERNETTI JUNIOR, 2009).

### 3 ARTIGO

#### MÉTODOS DE INOCULAÇÃO PARA SELEÇÃO DE CULTIVARES RESISTENTES À PÚSTULA BACTERIANA DA SOJA E AVALIAÇÃO DA AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Xanthomonas citri* pv. *glycines*

##### 3.1 RESUMO

A pústula bacteriana causada por *Xanthomonas citri* pv. *glycines* é considerada uma das mais sérias doenças bacterianas a nível global na cultura da soja. Os objetivos do estudo foram: testar diferentes condições de inoculação, avaliar diferentes métodos de inoculação artificial em casa-de-vegetação, determinar a agressividade e variabilidade patogênica de isolados da bactéria coletados em diferentes localidades e caracterizar cultivares comerciais de soja utilizando o protocolo proposto. Testaram-se três tempos de permanência das plantas em câmara úmida (12, 24 e 48 horas pré e pós-inoculação), três estádios fenológicos para inoculação (V2, V3 e V4, correspondentes a aproximadamente 15, 20 e 25 dias após semeadura - DAS) e duas concentrações de inóculo ( $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). Os métodos de inoculação avaliados foram: agulhas múltiplas, tesoura, pincel e aspersão, nos genótipos NT12 2042 (S), VMax (MS), BMX Potência (MR) e BRS 316 (R). Avaliaram-se a severidade, o tipo de sintoma, o tempo de inoculação e o volume de inóculo necessário para cada método. A agressividade de cinco isolados de *X. citri* pv. *glycines* foi avaliada nos genótipos NT12 2042 (S), Peking (S), VMax (MS) e BRS 316 (R). Com os dados de severidade de seis avaliações, calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença. A caracterização de resistência foi avaliada em 16 cultivares comerciais pelo método de aspersão e pelo método do pincel. As condições de inoculação mais adequadas foram inoculação no estádio V3 (20 DAS), com concentração de inóculo de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> e 24 horas de câmara úmida pré e pós inoculação. O método de aspersão foi o escolhido como o mais adequado, rápido e prático para *screening* de genótipos de soja em programas de melhoramento. Os testes de agressividade mostraram diferenças significativas entre os isolados, sendo os isolados 333, GDM 01 e GDM 02 os mais agressivos, enquanto os isolados 87-2 e GDM 03 foram os menos agressivos. Os ensaios de caracterização de cultivares mostraram diferenças nas reações de algumas cultivares quando inoculados com o método do pincel e com método de aspersão, o que sugere que o método do pincel superestima os sintomas da doença, não sendo o ideal para caracterizar cultivares para resistência à pústula bacteriana em programas de melhoramento.

**Palavras-chave:** *Glycine max*, protocolo de inoculação, virulência, *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

### 3.2 ABSTRACT

Bacterial pustule caused by *Xanthomonas citri* pv. *glycines* is considered one of the most serious bacterial diseases globally in soybean cultivation. The objectives of this study were: to test different inoculation conditions, to evaluate different methods of artificial inoculation in greenhouse, to determine the aggressiveness and pathogenic variability of bacterial isolates collected in different locations and to characterize commercial soybean cultivars using the proposed protocol. Three wet chamber periods were tested (12, 24 and 48 hours before and after inoculation), three inoculation phenological stages (V2, V3 and V4, corresponding to approximately 15, 20 and 25 days after sowing - DAS) and two inoculum concentrations ( $10^6$  and  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>). The inoculation methods evaluated were: multiple needles, scissors, brush and spray on the NT12 2042 (S), VMax (MS), BMX Power (MR) and BRS 316 (R) genotypes. Severity, symptom type, inoculation time and inoculum volume required for each method were evaluated. The aggressiveness of five *X. citri* pv. *glycines* isolates were evaluated on the NT12 2042 (S), Peking (S), VMax (MS) and BRS 316 (R) genotypes. With severity data from six evaluations, the area under the disease progress curve was calculated. The resistance was evaluated in 16 commercial soybean cultivars using spray method and brush method. The most suitable inoculation conditions were inoculation at V3 stage (20 DAS), with inoculum concentration of  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup> and 24 hours of wet chamber, before and after inoculation. The spray method was chosen as the most appropriate, quick and practical method for screening soybean genotypes in breeding programs. The aggressiveness tests showed a significant difference among the isolates. The 333, GDM 01 and GDM 02 isolates showed the highest aggressiveness, while 87-2 and GDM 03 isolates were the least aggressive. The cultivar evaluation tests showed differences among the cultivars when inoculated with the brush method and with the spray method, which suggests that the brush method overestimated the symptoms of the disease, not being ideal for evaluation of cultivars resistance to bacterial pustule in breeding programs.

**Key words:** *Glycine max.* Inoculation protocol. Virulence. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

### 3.3 INTRODUÇÃO

Na safra de 2019/2020, o Brasil tornou-se o maior produtor de soja (*Glycine max* L. Merrill) do mundo, ultrapassando os Estados Unidos, com uma produção de 120,9 milhões de toneladas, recorde histórico e que significou um acréscimo de 5,1% em relação à safra anterior (CONAB, 2020).

Dentre as doenças que afetam sua produtividade, a pústula bacteriana, cujo agente causal é *Xanthomonas citri* pv. *glycines* (Nakano 1919) Constantin et al. 2016 (sin. *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), é considerada uma das mais importantes doenças bacterianas da cultura (CHATNAPARAT; PRATHUANGWONG; LINDOW, 2016). No Brasil, estudos de monitoramento feitos por Bonaldo, Riedo e Lima (2009) em 16 municípios no Paraná mostraram a incidência da doença em 15,01% dos locais analisados.

Seus sintomas são expressos tipicamente nas folhas, iniciando-se por pequenas manchas de coloração verde-amarelada com o centro elevado de cor amarelo-palha, as quais se tornam necróticas em pouco tempo (HENNING et al., 2014). As pústulas formadas geralmente ocorrem na parte inferior da folha (JONES; FETT, 1987).

Atualmente, a utilização de cultivares resistentes é a principal forma de controle da doença. A resistência à pústula bacteriana é controlada pelo gene *rxp* presente na maioria das cultivares comerciais de soja (HARTWIG; LEHMAN, 1951; VAN et al., 2008). Entretanto, reduções na produtividade devido à ocorrência da doença continuam sendo relatadas (SAIN; GOUR, 2013; WRATHER; KOENNING, 2006). No Brasil, grande parte das cultivares comerciais apresentam resistência à pústula bacteriana (LANNA FILHO, 2015), embora, Soares e Arias (2016), em levantamento de linhagens de soja com resistência à doenças, observaram o decréscimo do número de cultivares resistentes à pústula bacteriana a partir de 2011.

Apesar da importância da doença na cultura da soja, não existem estudos da variabilidade genética da bactéria no Brasil e a hipótese de haver mais de uma raça do patógeno não deve ser descartada e carece de investigação (LANNA FILHO, 2015). Em estudo realizado por Athinuwat et al. (2009) na Tailândia, três raças fisiológicas da bactéria foram encontradas baseadas na diferença de patogenicidade expressa em cultivares inoculadas com diferentes isolados. Desta

maneira, se faz necessária a busca de novas fontes de resistência à doença, uma vez que o cultivo de genótipos de soja suscetíveis em grandes áreas pode resultar em epidemias de pústula bacteriana.

O desenvolvimento eficiente de metodologias de inoculação consiste numa importante etapa na seleção de genótipos resistentes em programas de melhoramento (SIVIERO et al., 2002). Na fitobacteriologia, estudos de etiologia, epidemiologia e controle requerem métodos de inoculação eficientes, práticos, de baixo custo e que tenham reprodutibilidade em casa-de-vegetação e campo (HENZ; TAKATSU; REIFSCHNEIDER, 1988), além de permitir uma avaliação quantitativa da doença (ANDRUS, 1948).

Embora comprovada a eficiência de vários métodos de inoculação utilizados para bactérias fitopatogênicas, são relatadas diferenças entre os níveis de expressão de doença em decorrência do método utilizado, o que pode levar à diferenças na caracterização de genótipos (EDDIN et al., 2005; PEÑÁZOVÁ et al., 2018). Maji e Nath (2015) compararam diferentes métodos de inoculação foliar da bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em plantas de repolho, testando seis diferentes métodos: pulverização com atomizador manual, abrasão com disco de corte, agulhas múltiplas, infiltração por seringa, inoculação diretamente nos hidatódios e cortes com tesoura. Os autores obtiveram resultados que indicaram diferença significativa entre os métodos avaliados, sendo que o método por abrasão com disco de corte resultou em maiores níveis de progressão da lesão.

Silva et al. (2009) compararam dois métodos de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, com tesoura e agulhas múltiplas em plantas de feijão. Através dos resultados obtidos concluíram que ambos são eficientes na expressão da doença, porém o método de agulhas múltiplas mostrou-se o mais prático durante a inoculação.

Em estudo sobre a eficiência de métodos de inoculação artificiais para expressão de mancha bacteriana causada por *Xanthomonas malvacearum* em algodão, Weindling et al. (1948) testou dois métodos de inoculação: (1) usando escova de dentes umedecida com suspensão bacteriana, tocando a folha em vários pontos e (2) pulverização da suspensão sobre a folha. Os autores concluíram que a infecção na planta decorrente do método de inoculação por aspersão era semelhante à ocorrência natural da doença e que este método foi o mais apropriado para o estudo da epidemiologia do patossistema.

Além do método de inoculação, fatores que afetam esse processo como concentração de inóculo, estágio de desenvolvimento da planta no momento da inoculação, períodos de molhamento foliar e permanência em câmara úmida podem gerar diferentes intensidades da doença. A determinação prévia das condições favoráveis para o estabelecimento da doença visando à infecção e colonização é importante para o estabelecimento de medidas de controle (AGRIOS, 2004). Além disso, é uma maneira que visa obter os sintomas da doença artificialmente de modo viável para sua avaliação em estudos fitopatológicos.

No Brasil, entre as exigências da legislação para se obter a proteção de cultivares, é necessária a comprovação de características de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade (DHE) para a cultivar. Dentre essas características está a caracterização de resistência à doenças. O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em publicação das instruções para execução dos ensaios de DHE de cultivares de soja, propõe o método de inoculação de *X. citri* pv. *glycines* com pincel para determinar a reação de cultivares à pústula bacteriana em ensaios de casa de vegetação (MAPA, 2007).

No caso da pústula bacteriana, tem-se verificado diferença entre o nível de resistência descrita no registro da cultivar e o comportamento observado em campo frente à pústula bacteriana, sendo, em alguns casos, menor a severidade observada no campo do que a descrita no registro. Isto sugere que o método de inoculação de *X. citri* pv. *glycines* proposto para caracterização de cultivares nos ensaios de DHE seja muito agressivo, caracterizando cultivares com níveis de resistência menores aos observados em campo em condições de ocorrência natural da pústula bacteriana.

Em programas de melhoramento, métodos de *screening* em ambiente controlado são necessários para identificar cultivares de soja resistentes à pústula bacteriana. Com este objetivo, a severidade da doença em cultivares de soja com inoculação artificial em casa-de-vegetação deve-se correlacionar com a observada em campo em condições de ocorrência natural da doença. Para isso, a escolha do método de inoculação do patógeno é de extrema importância, sendo necessários métodos práticos, ágeis, de baixo custo e que tenham correlação entre a reação em casa-de-vegetação com o comportamento das cultivares no campo sob incidência natural da doença.

De acordo com o apresentado, o estudo teve como objetivos: a) testar diferentes condições de inoculação (diferentes concentrações de inóculo, idades da planta no momento da inoculação e períodos de permanência das plantas em câmara úmida); b) avaliar diferentes métodos de inoculação artificial em casa-de-vegetação; c) determinar a agressividade e variabilidade patogênica de isolados da bactéria coletados em diferentes localidades e d) caracterizar cultivares comerciais de soja usando o método proposto para comparar com a reação que consta no registro destas cultivares e comparar também com o método do pincel.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na empresa GDM Seeds, localizada na cidade de Cambé, PR.

#### 3.4.1 Patógeno e Material Vegetal

Os isolados de *X. citri* pv. *glycines* utilizados foram o 333 (J. Rodrigues Neto, 1981/*Glycine max* - NCPPB 3659, Brasil) proveniente da coleção de Culturas de Fitobactérias IBSBF do Instituto Biológico de São Paulo. Isolados pertencentes à coleção da GDM Seeds, sendo estes obtidos da coleta de plantas suscetíveis (NT 12 2042) em campo com sintomas de pústula bacteriana nas cidades de Palotina-PR, Bela vista-PR e Dourados-MS, na safra de 2017/2018, e o isolado 87-2 (STALL, R. 1994/EUA) cedido pelo Laboratório de Bacteriologia e Diagnose em Fitossanidade do IDR – Paraná. (Tabela 1).

**Tabela 1** – Código, local e data de coleta e origem dos isolados *Xanthomonas citri* pv. *glycines* utilizados neste estudo.

<b>Código</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Data</b>	<b>Origem</b>
GDM 01	Dourados-MS	Safra 2017/18	GDM Seeds
GDM 02	Palotina-PR	Safra 2017/18	GDM Seeds
GDM 03	Bela Vista-PR	Safra 2017/18	GDM Seeds
333	N.I. <sup>1</sup> /J. Rodrigues Neto	1981	Instituto Biológico-SP
87-2	EUA / R. Stall	1994	IDR - Paraná

<sup>1</sup>N.I: Não identificado.

Fonte: o próprio autor, 2020.

A reativação da bactéria foi feita em placa com meio Ágar Nutriente (AN) a 28 °C por 48 horas. Após crescimento, foi repicada novamente em meio AN e mantida a 28 °C por 48 horas para preparo do inóculo.

As sementes foram tratadas com Captan SC 480 g i.a. L<sup>-1</sup>, na dose recomendada de 250 mL/100 kg de sementes. A semeadura foi realizada em vasos de 1 litro de volume contendo solo autoclavado, colocando sete sementes por vaso. O desbaste foi realizado aos 10 dias, deixando apenas três plantas por vaso. Os vasos foram mantidos em casa-de-vegetação até o momento da inoculação em condições controladas, temperatura máxima de 30 °C e mínima de 22 °C.

Após a inoculação e retirada da câmara úmida, as plantas foram mantidas sob nebulização automática a cada 20 minutos com o objetivo de manter a umidade relativa em 80%.

#### 3.4.2 Identificação Molecular Dos Isolados

Os isolados foram submetidos à análise molecular pelo seqüenciamento parcial do gene 16S para identificação gênica da espécie. Os isolados foram cultivados em caldo nutriente com agitação (200 rpm) a 28 °C por 16 h. O pellet obtido de 1 mL da cultura em caldo nutriente e foi utilizado para extração de DNA genômico, seguindo protocolo do kit de extração de DNA da Qiagen. A qualidade do DNA foi analisada em gel de agarose e a quantificação foi realizada por meio do NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). O DNA foi submetido à amplificação por PCR com os iniciadores universais fD1\_foward CCGAATTCGTCGACAAC e rD1\_reverse AGAGTTGATCCTGGCTCAG, do gene 16S rRNA (Weisburg et al., 1991). Cada reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL, que inclui 1 µL de DNA genômico; 2,5 µL de tampão para PCR 10 X; 1 µL de cada iniciador a 10 µM; 0,8 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 1 µL de dNTP 5 mM; 0,1 µL de DNA polimerase GoTaq (Promega Corp., Madison, WI, EUA) e 17,6 µL de água milliQ estéril. O programa de ciclagem otimizado foi constituído por desnaturação inicial a 94 °C por 3 min; seguido por 30 ciclos a 94 °C por 50 seg, temperatura de anelamento a 62,3 °C por 50 seg, e 72 °C por 1 min e 45 seg; finalizando com a temperatura de extensão a 72 °C por 7 min. O DNA amplificado foi submetido à eletroforese horizontal a 6 V cm<sup>-1</sup>, em gel de agarose 1% (p/v), corado com brometo de etídio e tampão 1 X TAE (0,04 M Tris-acetato, 0,001 M EDTA, pH 8,0). O

gel foi visualizado sob luz ultravioleta (U.V.) e fotodocumentado. Os produtos de PCR visualizados em gel de agarose foram purificados usando o Kit PureLink® (Quick Gel Extraction Kit – Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e seqüenciados em seqüenciador automático pelo método de Sanger – (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) na UNESP - Jaboticabal, SP.

Preliminarmente, as seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com seqüências depositadas no GenBank acessado através do NCBI (National Center for Biotechnology Information). A ferramenta utilizada para esta consulta foi o BLAST local - “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997). As seqüências foram preparadas para o alinhamento pelo programa “BioEdit v5.0.9” (Hall, 1999) e posteriormente alinhadas pelo programa “CLUSTALX v.1.81” (THOMPSON et al., 1997). Para obtenção da matriz de distância das árvores filogenéticas foi utilizado o método de construção da árvore “neighbor-joining” (SAITOU; NEI, 1987) e algoritmo “Tamura e Nei” (TAMURA; NEI, 1993), processado pelo programa MEGA X - Análise Genética de Evolução Molecular (KUMAR et al., 2018).

### 3.4.3 Ajuste Das Condições De Inoculação: Tempo De Câmara Úmida, Concentração De Inóculo e Estádio Fenológico

Experimentos preliminares foram realizados com o objetivo de selecionar as condições de inoculação mais práticas e adequadas para utilização em programas de melhoramento de soja, como período de permanência em câmara úmida na pré e na pós-inoculação, concentração de inóculo e estágio fenológico das plantas.

Para os testes, a linhagem de soja utilizada foi a NT12 2042, suscetível à pústula bacteriana. Foram realizadas três sementeiras com intervalos de 5 dias resultando em plantas de 15, 20 e 25 dias após a sementeira (DAS).

Foram testados três tempos de permanência em câmara úmida, sendo estes 12, 24 e 48 horas pré e pós inoculação. Dentro de cada tempo de câmara úmida, testaram-se três estádios fenológicos da planta para inoculação e duas concentrações de inóculo da suspensão bacteriana. A câmara úmida foi realizada em bandejas de metal de 2,89 x 1,10 m com arcos de aproximadamente

70 cm de altura para facilitar a cobertura de todas as plantas com plástico transparente. As bandejas receberam água pela metade, afim de manter a umidade.

Os estádios da planta testados para a inoculação foram 15 DAS (V2), 20 DAS (V3) e 25 DAS (V4) e as concentrações de inóculo foram  $10^6$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. O ajuste da concentração do inóculo foi realizado em espectrofotômetro (D.O: 600 nm = 0,2). A suspensão bacteriana foi preparada em água destilada esterilizada e aplicada por aspersão com pulverizador manual nas faces abaxiais e adaxiais das folhas. Plantas controle receberam somente aplicação de água destilada. As médias de temperatura mínima e máxima após a inoculação até o momento da avaliação variaram de 26 a 29°C, respectivamente.

Após o aparecimento e estabelecimento dos sintomas, aos 15 dias após a inoculação, a severidade da pústula bacteriana foi avaliada de forma direta e visual, estimando a porcentagem de área foliar afetada (% A.F.), sendo feita somente por um avaliador.

Visto que a concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> apresentou diferença significativa em todos os tempos de câmara úmida testados, realizou-se um segundo experimento onde se padronizou a concentração de inóculo para  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> e os fatores avaliados para otimizar as condições de inoculação foram tempo de câmara úmida e estádio fenológico das plantas. Após a inoculação, as plantas foram mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente e a média de temperatura mínima e máxima variou de 27 a 29°C, respectivamente.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados em esquema fatorial com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Os dados que não cumpriram os pressupostos da análise de variância foram transformados de acordo com Box-Cox. A análise dos dados foi realizada com o software estatístico R Studio utilizando o pacote ExpDes (R CORE TEAM, 2019).

#### 3.4.4 Métodos De Inoculação De *Xanthomonas citri* pv. *glycines*

O isolado de *X. citri* pv. *glycines* utilizado foi o 333 e os genótipos de soja foram o NT 12 2042 (suscetível), VMax RR (moderadamente suscetível), BMX

Potência RR (moderadamente resistente) e BRS 316 RR (resistente). A reativação do isolado e a preparação do material vegetal foi descrito no item 3.4.1.

Foram avaliados quatro métodos de inoculação de *X. citri* pv. *glycines*: agulhas múltiplas, pincel, tesoura e aspersão. Baseados nos resultados dos testes para ajuste das condições de inoculação, as plantas foram inoculadas com suspensão bacteriana de aproximadamente  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> aos 20 DAS.

Para o método de inoculação com agulhas múltiplas, foi utilizada a metodologia descrita por Silva et al. (2009), usando um dispositivo composto por uma rolha de 2 cm de diâmetro com cinco agulhas colocadas de forma equidistante. Sobre os folíolos do primeiro trifólio completamente desenvolvido de cada planta, uma esponja umedecida com a suspensão bacteriana foi pressionada sobre a folha com as agulhas. Os sintomas foram avaliados conforme a escala utilizada por Maringoni e Lauretti (1999) em avaliação de crestamento bacteriano comum em feijoeiro com adaptações. Atribuíram-se notas de 1 a 4, 1: plantas sem sintomas (pústulas, clorose ou necrose); 2: leve clorose ao redor da área inoculada; 3: clorose e presença de poucas pústulas bacterianas na área inoculada e 4: clorose, alta incidência de pústulas bacterianas e necrose na área inoculada.

A inoculação com tesoura foi baseada na metodologia de Pastor-Corrales, Beebe e Correa (1981) proposta para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Para isso, com tesoura previamente esterilizada e imersa na suspensão bacteriana foram realizados cinco cortes de aproximadamente 1 cm de comprimento na borda dos folíolos do primeiro trifólio completamente desenvolvido de cada planta. Para cada corte realizado, a tesoura foi imersa na suspensão bacteriana. Para avaliação do método de tesoura, foi utilizada a escala proposta por Pastor-Corrales (1981) citada por Andrade et al. (2017) com adaptações, sendo 1: plantas sem sintomas (corte com tesoura não apresenta clorose ou necrose); 2: leve clorose a partir do corte com tesoura; 3: leve clorose e presença de necrose a partir do corte com tesoura e 4: clorose bem desenvolvida a partir do corte com tesoura (aproximadamente 1 mm) e necrose na área inoculada.

O método do pincel utilizado é o descrito no protocolo para caracterização a pústula bacteriana proposto pelo MAPA (2007). Um pincel esterilizado foi imerso na suspensão bacteriana e passado sobre a superfície abaxial dos folíolos do primeiro trifólio completamente desenvolvido de cada planta. Para a avaliação utilizou-se a escala de 3 níveis definida pelo MAPA (2007), sendo nota 1:

planta resistente (plantas sem sintomas de pústulas, clorose ou necrose); nota 2: planta moderadamente resistente (plantas sem sintomas de pústulas, com leve clorose a partir da área lesionada pelo pincel); nota 3: planta suscetível (incidência de pústulas na área lesionada pelo pincel, clorose bem desenvolvida e necrose nos folíolos).

O método de inoculação por aspersão foi realizado conforme metodologia descrita por Kronka (2004) com o auxílio de um borrifador manual com volume de 500 mL. O inóculo foi borrifado na face abaxial dos folíolos, a uma distância de aproximadamente 2 cm, até ponto de escorrimento. A severidade da pústula bacteriana foi avaliada de forma direta e visual, estimando a porcentagem de área foliar afetada (% A.F.), sendo feita somente por um avaliador.

Adicionalmente, foi incluído um tratamento controle em que todos os genótipos de soja foram inoculados usando os 4 métodos de inoculação apenas com água destilada esterilizada, com o objetivo de comparar possíveis injúrias causadas pelo método utilizado.

As plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 horas pré e 24 horas pós inoculação. Após a retirada da câmara úmida, as plantas foram mantidas sob nebulização automática a cada 20 minutos a fim de manter alta umidade relativa (80%) até o momento da avaliação. No experimento 1, as médias de temperatura mínima e máxima após inoculação até o momento da avaliação variaram entre 26 e 29°C, respectivamente. No experimento 2, as médias de temperatura mínima e máxima variaram entre 28 e 30°C, respectivamente.

A avaliação da severidade da doença foi iniciada com a detecção dos primeiros sintomas no padrão suscetível (NT 12 2042), sendo todas as avaliações realizadas somente por um avaliador. Foi também avaliada a praticidade de cada método de inoculação, sendo contabilizado o tempo de inoculação e o volume de inóculo necessário para cada método.

O experimento foi realizado duas vezes. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados que não cumpriram os pressupostos da análise de variância foram transformados de acordo com Box-Cox. A análise dos dados foi realizada com o software estatístico R Studio utilizando o pacote ExpDes (R CORE TEAM, 2019).

### 3.4.5 Agressividade Dos Isolados

Foi avaliada a agressividade dos isolados GDM 01, GDM 02, GDM 03, 333 e 87-2. Os isolados foram reativados e o material vegetal preparado de acordo com o descrito no item 3.4.1. Os genótipos inoculados foram NT 12 2042 (suscetível), Peking (suscetível), VMax RR (moderadamente suscetível) e BRS 316 RR (resistente).

As plantas foram inoculadas aos 20 DAS usando o método de aspersão. A partir do aparecimento dos sintomas no genótipo suscetível, no quarto dia após a inoculação, foram realizadas avaliações a cada três dias. O desenvolvimento da doença foi monitorado em trifólios identificados (primeiro e segundo trifólios de cada planta) até o décimo nono dia após a inoculação. A severidade foi estimada pela porcentagem de área foliar afetada (% A.F.) de forma direta e visual, sendo feita somente por um avaliador.

Em ambos os experimentos, as médias de temperatura mínima e máxima após inoculação até o momento da avaliação foram 28 e 30°C, respectivamente.

Com os dados de severidade (% A.F. afetada) foi construída a curva de progresso da doença e calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) para cada isolado. A AACPD foi calculada de acordo com a equação de Shaner e Finney (1977) e normalizada, dividindo o valor de AACPD pelo tempo total de duração do experimento (números de dias da primeira ocorrência de doença até o fim do período de avaliação) (FRY, 1978).

O experimento foi realizado duas vezes. O delineamento foi em blocos casualizados com cinco repetições. As amostras foram submetidas à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Os dados que não cumpriram os pressupostos da análise de variância foram transformados de acordo com Box-Cox. A análise dos dados foi realizada com o software estatístico R Studio utilizando o pacote ExpDes (R CORE TEAM, 2019).

### 3.4.6 Caracterização da Resistência de Cultivares à Pústula Bacteriana

Para caracterização da resistência de cultivares foram utilizadas 16 cultivares comerciais de soja registradas dentro de todos os grupos de reações à pústula bacteriana, ou seja, cultivares suscetíveis, moderadamente suscetíveis, moderadamente resistentes e resistentes. A linhagem NT 12 2042 e a cultivar BRS 316 RR foram mantidas como padrões de suscetibilidade e resistência, respectivamente. (Tabela 2).

**Tabela 2** – Cultivares de soja utilizadas para caracterização de resistência à pústula bacteriana e sua reação à doença de acordo com o registro da empresa detentora da cultivar.

Genótipos	Reação para pústula bacteriana <sup>1</sup>
NT 12 2042	Controle suscetível
BR-4	S
DESAFIO RR	S
SYN 1561	S
TABARANA	S
ZEUS IPRO	MS
NEO 530 IPRO	MS
BRS 184	MR
FOCO IPRO	MR
M 6410 IPRO	MR
M 7739 IPRO	MR
M 8349 IPRO	MR
NA 7337 RR	MR
DM 81184 IPRO	R
DOMÍNIO IPRO	R
M 6210 IPRO	R
TMG 2284 IPRO	R
BRS 316 RR	Controle resistente

Fonte: o próprio autor, 2020.

<sup>1</sup>Reação frente a pústula bacteriana expressa de acordo com o registrado no portfólio das empresas, sendo S: suscetível, MS: moderadamente suscetível, MR: moderadamente resistente e R: resistente.

O isolado foi reativado e o material vegetal preparado de acordo com o descrito no item 3.4.1. A inoculação foi realizada com o isolado 333 aos 20 DAS usando o método de aspersão e o método do pincel. Foi incluído também um tratamento controle que consistiu em genótipos de soja inoculados com os dois métodos de inoculação utilizando apenas água destilada esterilizada.

A avaliação foi realizada após o estabelecimento dos sintomas no genótipo suscetível. Para o método de aspersão, a avaliação foi realizada estimando a porcentagem de área foliar afetada (% A. F.) e para o método do pincel utilizou-se a escala proposta pelo MAPA (2007) para avaliação de *X. citri* pv. *glycines* nos ensaios de DHE.

As médias de temperatura mínima e máxima após inoculação até o momento da avaliação variaram entre 28 e 30°C, respectivamente, para os dois experimentos.

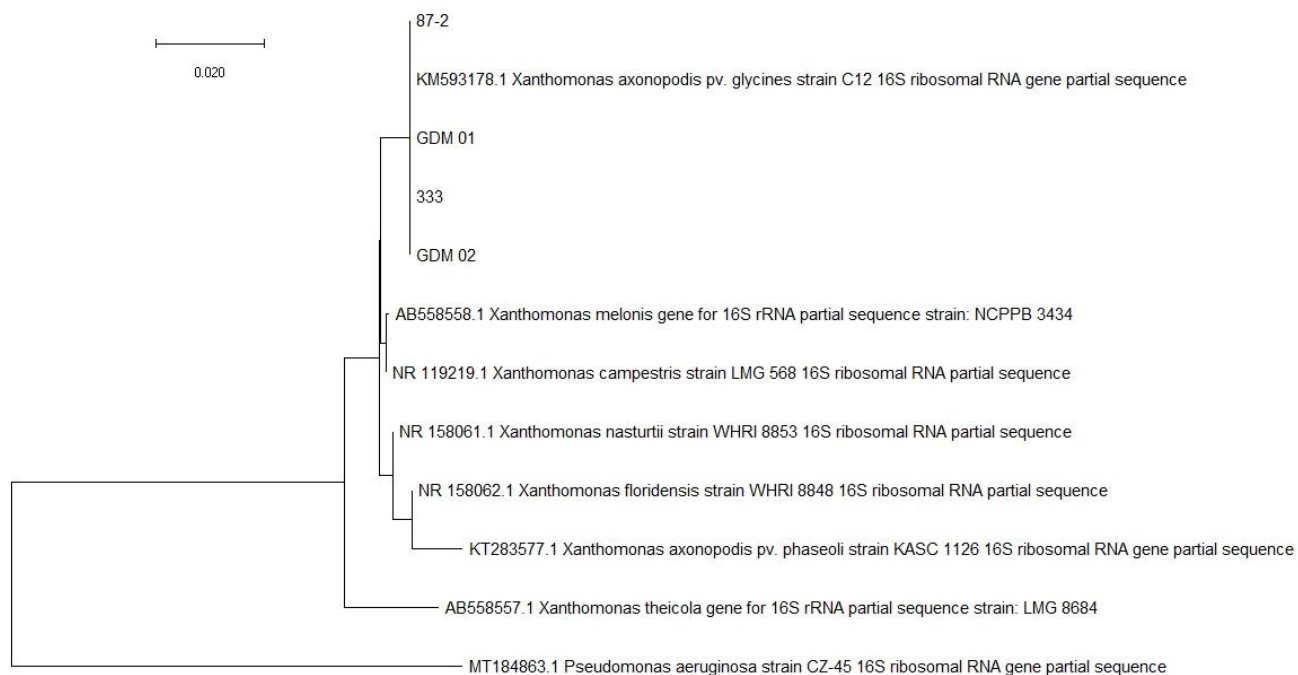
O experimento foi realizado duas vezes. O delineamento foi em blocos casualizados com três repetições. Os dados de % A. F. foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% probabilidade. Os dados que não cumpriram os pressupostos da análise de variância foram transformados de acordo com Box-Cox. A análise dos dados foi realizada com o software estatístico R Studio utilizando o pacote ExpDes (R CORE TEAM, 2019).

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.5.1 Identificação Molecular

O seqüenciamento genômico dos isolados GDM 01, GDM 02, 333 e 87-2 apresentou 97,15%, 99,02%, 98,64% e 97,59%, respectivamente, de similaridade com *X. axonopodis* pv. *glycines* strain C12 16s ribosomal RNA gene (sinônimo de *X. citri* pv. *glycines*), que está depositado no GenBank sob o número de acesso KM593178.1. A árvore filogenética está apresentada na figura 3. Utilizando a *Pseudomonas aeruginosa* como grupo externo, a análise do gene 16S mostrou que os isolados GDM 01, GDM 02, 333 e 87-2 são *X. axonopodis* pv. *glycines* devido à sua alta similaridade com a espécie e patovar.

**Figura 3** – Árvore filogenética com base na análise do gene 16S mostrando agrupamento dos isolados GDM 01, GDM 02, 333 e 87-2 com o patovar *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* acesso KM593178.



Fonte: o próprio autor, 2021.

### 3.5.1 Ajuste das Condições de Inoculação: Tempo de Câmara Úmida, Concentração de Inóculo e Estádio Fenológico

Ao quinto dia após inoculação (DAI), as plantas já apresentaram os primeiros sintomas da doença, com pequenas manchas cloróticas na superfície abaxial e início da formação de pequenas pústulas de coloração verde clara. Aos 15 daí, os sintomas já estavam estabelecidos e a avaliação foi realizada. A Tabela 3 mostra a severidade (em % de A.F.) da doença nas plantas inoculadas com duas concentrações de inóculo aos 15, 20 e 25 DAS e que permaneceram em câmara úmida pré e pós inoculação por 12 horas. Não houve interação significativa entre os fatores concentração de inóculo e estágio fenológico das plantas que permaneceram 12 horas em câmara úmida pela análise de variância a 5% de probabilidade e, portanto, foram analisados os efeitos simples de cada fator (Tabela 3).

**Tabela 3** – Severidade da pústula bacteriana (% de A.F.) em plantas do genótipo NT 12 2042 inoculadas com duas concentrações de inóculo de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* e três estádios fenológicos (dias após semeadura - DAS) com 12 horas de permanência em câmara úmida (pré e pós-inoculação).

DAS (Estádio fenológico)	Concentração de inóculo (UFC mL <sup>-1</sup> )		
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	Média <sup>1</sup>
25 (V4)	16,6	41,0	28,8 a
20 (V3)	4,4	11,4	7,9 b
15 (V2)	2,6	5,4	4,0 b
Média <sup>1</sup>	7,8 B	19,2 A	

<sup>1</sup>C.V (%): 13,69. Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias originais, para análise os dados foram transformados por  $\log X$ .

É possível observar que houve diferença significativa entre as concentrações de inóculo de 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, apresentando valores de porcentagem de severidade de 7,8 e 19,2%, respectivamente. Em relação ao estágio fenológico, observa-se que a inoculação aos 15 DAS (V2) e 20 DAS (V3) apresentaram menores valores de severidade, 4,0 e 7,9% respectivamente, e não apresentaram diferenças entre si. Aos 25 DAS (V4) a severidade foi de 28,8%; diferindo significativamente dos outros dois estádios avaliados.

As plantas que permaneceram em câmara úmida por 24 h pré e pós-inoculação também não apresentaram interação significativa entre os fatores concentração de inóculo e estágio fenológico a 5% de probabilidade.

Observa-se que, da mesma forma que os dados de permanência de 12 h em câmara úmida, as concentrações de inóculo testadas de 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> apresentaram diferenças significativas entre si, com severidade de 2 e 38,4%, respectivamente. Por outro lado, os três estádios fenológicos testados não manifestaram diferença significativa entre si.

Os efeitos simples de cada fator estão apresentados na Tabela 4, que mostra as médias gerais expressas em porcentagem de severidade, dos fatores concentração de inóculo e estágio fenológico das plantas que permaneceram por 24 h em câmara úmida.

**Tabela 4** – Severidade da pústula bacteriana (% de A.F.) em plantas inoculadas com duas concentrações de inóculo de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* e três estádios fenológicos (dias após semeadura - DAS) com 24 horas de permanência em câmara úmida (pré e pós-inoculação).

DAS / Estádio fenológico	Concentração de inóculo (UFC/mL)		
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	Médias <sup>1</sup>
25 (V4)	4,4	43,0	23,7 a
20 (V3)	1,4	40,0	20,7 a
15 (V2)	0,4	32,2	16,3 a
Médias <sup>1</sup>	2,0 B	38,4 A	

<sup>1</sup>C.V (%): 10,03. Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias originais, para análise os dados foram transformados por  $\log_{10} X$ .

De mesma maneira como as plantas em permanência de 12 h e 24 h em câmara úmida, as plantas que permaneceram 48h não apresentaram interação significativa entre os fatores concentração de inóculo e estádio fenológico pela análise de variância a 5% de probabilidade. A tabela 5 mostra os efeitos simples de cada fator.

**Tabela 5** – Severidade da pústula bacteriana (% de A.F.) em plantas inoculadas com duas concentrações de inóculo de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* e três estádios fenológicos (dias após semeadura - DAS) com 48 horas de permanência em câmara úmida (pré e pós-inoculação).

DAS / Estádio fenológico	Concentração de inóculo (UFC/mL)		
	10 <sup>6</sup>	10 <sup>8</sup>	Médias <sup>1</sup>
25 (V4)	15,2	71,0	43,3 a
20 (V3)	1,6	64,0	32,8 ab
15 (V2)	0,6	49,8	25,2 b
Médias <sup>1</sup>	5,8 B	61,7 A	

<sup>1</sup>C.V(%): 2,05. Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias originais, para análise os dados foram transformados utilizando valor absoluto de  $\lambda$  estimado por Box-Cox.

De acordo com os dados expostos na Tabela 5, da mesma maneira

como apresentado nas Tabelas 3 e 4, a concentração de inóculo fez grande diferença entre os valores de severidade de pústula bacteriana, com diferenças significativas entre si. Para a concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, o valor médio de severidade foi de 5,8%; e para a concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a porcentagem de severidade média na área foliar foi de 61,7%. Em relação aos estádios fenológicos, houve diferença significativa entre 15 DAS e 25 DAS, correspondendo a valores médios de severidade de 25,2 e 43,3% respectivamente.

O experimento foi repetido, no entanto, com a concentração de inóculo de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> a qual determinou maiores níveis de doença em todos os períodos de permanência em câmara úmida testados, foi a escolhida para o segundo experimento.

Os fatores avaliados no segundo experimento foram os três estádios fenológicos e três tempos de câmara úmida. Houve interação significativa entre os fatores estágio fenológico e tempo de câmara úmida (Tabela 6).

**Tabela 6** – Severidade de pústula bacteriana (% de A.F) em plantas de soja inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* em diferentes estádios fenológicos (dias após a semeadura-DAS) e diferentes tempos pré e pós-inoculação em câmara úmida (horas).

DAS / Estádio fenológico	Tempo câmara úmida (h)		
	12	24	48
<b>25 (V4)</b>	50,0 Ba	52,0 Ba	76,0 Aa
<b>20 (V3)</b>	30,0 Cb	44,0 Bb	54,0 Ab
<b>15 (V2)</b>	0,4 Ac	4,2 Ac	5,0 Ac

<sup>1</sup>C.V(%): 14,14. Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com os dados expostos da Tabela 6, é possível constatar que em cada um dos três tempos de câmara úmida a severidade das plantas com 15, 20 e 25 DAS difere significativamente entre si, sendo sempre a maior severidade em plantas com 25 DAS e menor com plantas com 15 DAS. A condição testada que apresentou maior porcentagem de severidade foi aos 25 DAS com 48 horas de

permanência em câmara úmida, resultando em severidade de 76%, e a menor foi registrada em plantas inoculadas com 15 DAS e 12 horas de câmara úmida, 0,4%.

Em relação ao tempo de câmara úmida, nota-se que plantas inoculadas aos 15 DAS não apresentaram diferenças de severidade quando mantidas em câmara úmida por 12, 24 e 48 horas pré e pós-inoculação. Por outro lado, os valores de severidade são considerados baixos para avaliar a expressão da pústula bacteriana. Em contrapartida, aos 20 e 25 DAS houve aumento significativo da área foliar afetada pela doença nas plantas e estas apresentaram diferença na expressão dos sintomas entre os diferentes tempos de câmara úmida testados.

Embora a condição de 25 DAS e 48 horas tenha apresentado a maior severidade, escolheu-se para dar continuidade aos experimentos a combinação de 24 h de permanência em câmara úmida e 20 DAS para inoculação, visto que esta apresentou severidade de 44%, sendo considerada uma severidade suficiente para os testes de métodos de inoculação e caracterização de resistência de cultivares, além de necessitar menos tempo de utilização da casa-de-vegetação para o teste. Levou-se também em consideração que 48 horas de câmara úmida pré e pós inoculação resultaram em plantas que apresentaram murcha incipiente devido ao longo período de permanência em câmara úmida. Outro fator levado em conta foi que plantas inoculadas aos 25 DAS e 48 horas de câmara úmida determinaram uma severidade muito elevada, de 76%, a qual avaliou-se como sendo uma condição muito agressiva de inoculação. Como um dos objetivos do trabalho é caracterizar cultivares resistentes, esta grande pressão de inóculo poderia mascarar uma resistência moderada.

A maior severidade constatada no maior estágio fenológico (25 DAS) corrobora com o obtido nos estudos de Neves et al. (2014) e Silva (2007), porém diferem do trabalho de Melching et al. (1988) onde foi observada uma maior eficiência de infecção de *Phakopshora pachyrhizi* em plantas de soja mais novas do que em plantas mais velhas.

O estágio fenológico das plantas é um importante fator que afeta diretamente o desenvolvimento das doenças (FURTADO et al., 2009), no entanto, diversos outros fatores como cultivar, patógeno e condições ambientais estão envolvidos. Dependendo do patógeno, a suscetibilidade do tecido do hospedeiro pode aumentar ou decrescer ao longo do tempo (FURTADO et al., 2009). A diferença nos sintomas observados em diferentes estádios das plantas pode

também estar afetada por eventos pós-infecciosos, como a quantidade e o tipo de compostos fenólicos que ocorrem em plantas de diferentes idades que podem inibir o crescimento bacteriano (LI; STEFFENS, 2002).

O período de permanência em câmara úmida também foi significativo, sendo a permanência por 48 h pré e pós inoculação responsável pela maior incidência da doença. As bactérias causadoras de doenças em plantas não possuem a capacidade de exercer força mecânica ou física para vencer barreiras como a da parede celular e a pressão de turgor da planta, e, por conseqüência, penetrar em células epidérmicas intactas (GOODMAN, 1986). Devido a isto, a grande maioria penetra na planta apenas por ferimentos e/ou aberturas naturais como os estômatos e hidatódios. Quando a umidade relativa do ar está baixa, os estômatos se fecham para evitar a transpiração e assim, a perda de água (REIS; OLIVARES, 2006). Possivelmente, o maior período de permeância em câmara úmida proporcionou melhores condições de abertura estomática e molhamento foliar, resultando em maior porcentagem de área foliar afetada. De acordo com Graham et al. (1992), as características foliares, como abertura estomática, que influenciam a infiltração de água no tecido foliar são as mais importantes para o sucesso da infecção do patógeno, pois a água livre na superfície foliar é essencial para a penetração e movimentação de bactérias fitopatogênicas no hospedeiro, principalmente para as que penetram por aberturas naturais (BEATTIE; LINDOW, 1999; ROMEIRO, 2007).

### 3.5.2 Métodos De Inoculação

Os valores de severidade de cada método de inoculação nas diferentes cultivares estão apresentadas na Tabela 7, sendo os experimentos avaliados aos 15 DAI. No método de inoculação por agulhas múltiplas, foi possível observar diferença significativa entre a cultivar suscetível e as demais. Em ambos os experimentos, a linhagem NT 12 2042 apresentou as maiores notas de severidade, diferindo das demais cultivares, enquanto a BMX Potência RR, Vmax RR e BRS 316 RR não apresentaram diferenças significativas entre si.

Nos experimentos, o método de pincel também apresentou diferenças significativas na severidade entre a cultivar suscetível e as demais

(Tabela 7). No experimento 1, a linhagem NT 12 2042 apresentou nota de 2,8; diferindo das demais, enquanto as cultivares Vmax RR, BMX Potência RR e BRS 316 RR não apresentaram diferenças significativas. No experimento 2, a cultivar NT 12 2042 teve nota 3, também diferindo estatisticamente de todas as outras.

**Tabela 7** – Severidade de pústula bacteriana em plantas de soja inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* isolado 333 para quatro diferentes métodos de inoculação.

Cultivar	Método de inoculação			
	Experimento 1 <sup>1</sup>			
	Agulhas <sup>2</sup> (nota)	Pincel <sup>3</sup> (nota)	Tesoura <sup>4</sup> (nota)	Aspersão <sup>5</sup> (% A. F.)
NT 12 2042	3,6 a	2,8 a	2,1 a	32,6 a
VMAX RR	1,8 b	1,2 b	1,9 ab	0 b
BMX POTÊNCIA RR	1,2 b	1,8 b	1,6 bc	0 b
BRS 316 RR	1,0 b	1,2 b	1,4 c	0 b
CV (%)	7,9	8,6	11,7	14,9
Cultivar	Experimento 2 <sup>1</sup>			
	Agulhas <sup>2</sup> (nota)	Pincel <sup>3</sup> (nota)	Tesoura <sup>4</sup> (nota)	Aspersão <sup>5</sup> (% A. F.)
	NT 12 2042	3,2 a	3,0 a	3,6 a
VMAX RR	1,6 b	1,4 b	2,6 b	1,3 b
BMX POTÊNCIA RR	1,2 b	1,4 b	1,0 c	0 b
BRS 316 RR	1,0 b	1,0 b	1,0 c	0 b
CV (%)	7,0	8,4	6,9	10,7

<sup>1</sup>Medias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Medias originais, para análise os dados foram transformados por  $\sqrt{x+1}$ .

<sup>2</sup>Notas: 1: plantas sem sintomas (pústulas, clorose e necrose); 2: leve clorose ao redor da área inoculada; 3: clorose e presença de poucas pústulas bacterianas na área inoculada e 4: clorose, alta incidência de pústulas bacterianas e necrose na área inoculada.

<sup>3</sup>Notas: 1: resistente (plantas sem sintomas de pústulas, clorose e necrose) 2: moderadamente resistente (plantas sem sintomas de pústulas bacterianas, apresenta leve clorose a partir da área lesionada pelo pincel) e 3: suscetível (apresenta grande incidência de pústulas bacterianas na área lesionada pelo pincel, clorose bem desenvolvida e necrose nos folíolos)

<sup>4</sup>Notas: 1: plantas sem sintomas (corte com tesoura não apresenta clorose e necrose); 2: leve clorose a partir do corte com tesoura; 3: leve clorose e presença de necrose a partir do corte com tesoura e 4: clorose bem desenvolvida a partir do corte com tesoura (cerca de 1 mm) e necrose na área inoculada.

<sup>5</sup>% de Área foliar (A.F.) afetada

Pelo método de tesoura houve diferença significativa somente entre a linhagem suscetível NT 12 2042 e a cultivar resistente BRS 316 RR no primeiro

experimento, enquanto no segundo experimento a NT 12 2042 diferiu das demais, A BMX Potência RR e aBRS 316 RR não apresentaram diferenças quando comparadas.

O método de aspersão apresentou diferenças significativas entre a cultivar suscetível e todas as outras, sendo que BRS 316 RR e BMX Potência RR não apresentaram sintomas de pústula bacteriana. No experimento 1, a severidade na linhagem suscetível foi de 32,6% de área foliar afetada, enquanto no experimento 2 apresentou cerca de 35,4%.

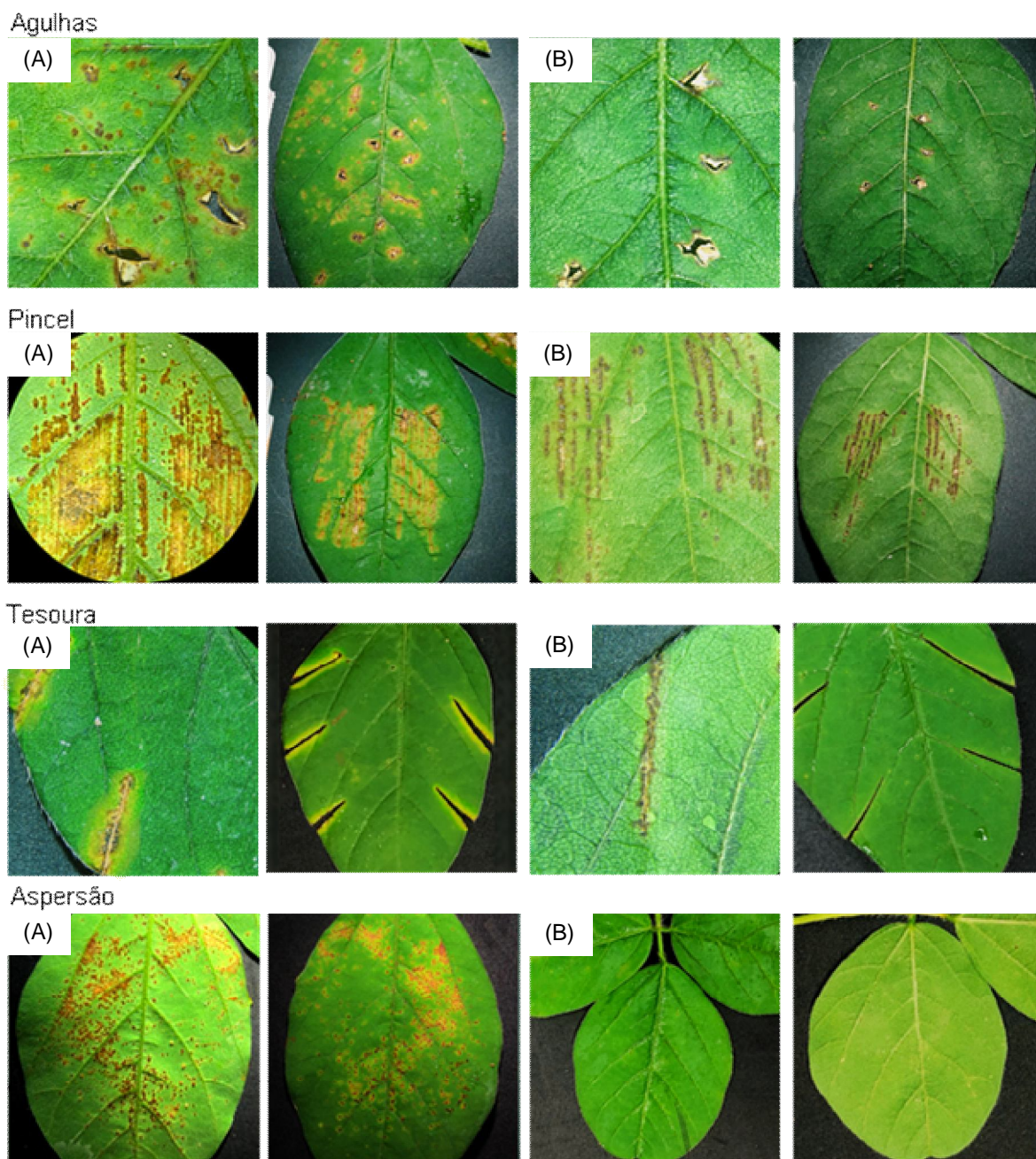
A cultivar BRS 316 RR, padrão de resistente, não apresentou sintomas típicos da doença em nenhum dos métodos avaliados. A figura 1 mostra os sintomas da doença nos genótipos suscetível (NT 12 2042) e resistente (BRS 316 RR) ocasionada pelos diferentes métodos de inoculação testados.

A linhagem NT 12 2042 (suscetível) desenvolveu sintomas da doença, com a formação de pústulas bacterianas e halo clorótico, nos métodos de aspersão, agulhas e pincel. No método do pincel, as pústulas bacterianas formadas ficaram restritas aos ferimentos ocasionado, não havendo distribuição pelo restante da superfície foliar.

Pelo método da tesoura, não houve sintomas de pústulas, somente a formação de pequenos halos cloróticos a partir do ferimento feito com a tesoura, constatando a não eficiência deste método para avaliação e quantificação de severidade de *X. citri* pv. *glycines*. Dentre os critérios que são levados em consideração para determinar a qualidade de um método de inoculação é o de prover que a reação à infecção possa ser avaliada quantitativamente (ANDRUS, 1948).

Embora os métodos de agulhas e pincel se mostrassem eficientes em expressar os sintomas da doença, estes ocasionaram lesões nas folhas. No caso do pincel, as lesões podem ser facilmente confundidas com sintomas de necrose causados pela bactéria *X. citri* pv. *glycines*, além da distribuição dos sintomas não se parecer com a da infecção natural da doença. Ao contrário do método de aspersão, a inoculação local auxiliada por ferimentos, distribui as células bacterianas em locais específicos da superfície da planta levando a menos pontos de infecção (SHARMA et al., 2017).

**Figura 1** – Severidade de pústula bacteriana aos 15 dias após a inoculação nos genótipos de soja suscetível (A) NT 12 2042 e resistente (B) BRS 316 RR inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* usando quatro diferentes métodos.



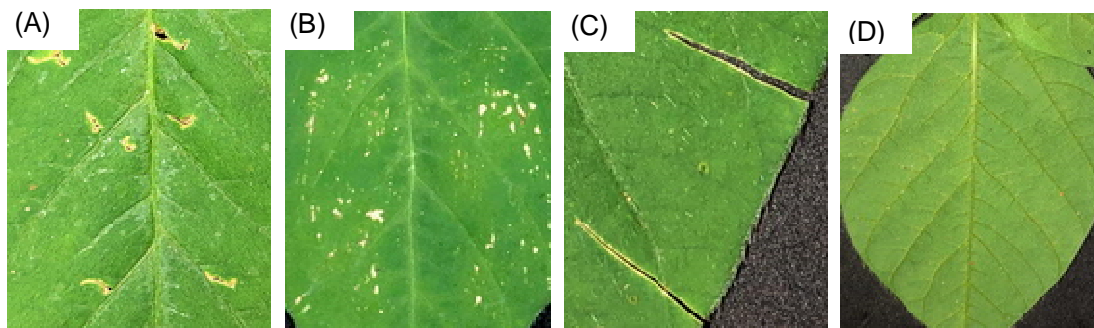
Fonte: O próprio autor, 2020.

O método de aspersão foi o único que não lesionou o tecido foliar resultando em maior homogeneidade na distribuição dos sintomas. Este foi o único método que permitiu a expressão das pústulas em todo o limbo foliar, com

distribuição das lesões semelhante à que ocorre a campo com infecção natural pela bactéria. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Weindling et al. (1948) e Sharma et al. (2017), os quais testaram a eficiência de diferentes métodos de inoculação para avaliação de *Xanthomonas malvacearum* e *Xanthomonas citri* pv. *punicae*, respectivamente, e concluíram que a infecção na planta decorrente do método de inoculação por aspersão foi a mais semelhante à que ocorre por infecção natural.

A diferenciação entre o sintoma da doença e a injúria causada pelo método de inoculação foi estabelecida com o tratamento controle. O controle foi inoculado com o mesmo procedimento usado no método de inoculação (ferimento com agulhas, com pincel, corte com tesoura e aspersão), mas na ausência do patógeno. Nestes tratamentos não foram observados sintomas característicos da infecção pela bactéria, como halo clorótico e pústulas bacterianas (Figura 2).

**Figura 2** – Injúrias causadas nas folhas pelos diferentes métodos de inoculação nos tratamentos controle de cada método utilizando água estéril: (A) agulhas; (B) pincel; (C) tesoura e (D) aspersão.



Fonte: O próprio autor, 2020.

Nota-se que o método de inoculação com pincel (B) foi um dos métodos que causou maior injúria no tecido foliar. A principal diferença entre os métodos de inoculação por aspersão e pincel é o ferimento causado pelo método do pincel, visto que este método garante que as células bacterianas cheguem aos espaços intercelulares das folhas sem que a bactéria tenha que enfrentar as possíveis condições adversas, que afetariam seu progresso em condições naturais

(LOGAN, 1958). A mesma hipótese se aplica ao método de agulhas, que causa ferimento no tecido foliar. Além disso, o ferimento causado não teve vantagem adicional em comparação ao método de aspersão.

A avaliação de praticidade dos métodos, considerada pelo tempo necessário e o volume de inóculo gastos está apresentada na Tabela 8.

**Tabela 8** – Tempo de execução e volume da suspensão bacteriana necessários para a inoculação de 60 plantas de soja com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* utilizando os métodos de inoculação tesoura, agulhas, pincel e aspersão.

<b>Método</b>	<b>Tempo (minutos)</b>	<b>Suspensão bacteriana (mL)</b>
Agulhas	21	200
Pincel	16	8
Tesoura	28	40
Aspersão	10	500

O método que demandou menos tempo foi o método de aspersão e a inoculação com tesoura foi o método mais demorado para inocular 60 plantas de soja, com 10 e 28 minutos, respectivamente. Os métodos do pincel e agulhas além de serem mais demorados, exigem maior mão de obra e maior cuidado ao inocular, visto que causam ferimentos nos folíolos, e caso não haja cuidado, pode-se levar ao retalhamento ou rompimento do limbo foliar, dependendo da força e rapidez empregada no momento da inoculação.

Dentro de um programa de melhoramento para avaliação e seleção de genótipos resistentes, deve-se levar em consideração critérios como rapidez, uniformidade nos resultados e facilidade de execução (PASTOR-CORRALES; BEEBE; CORREA, 1981), fatores estes, que não foram cumpridos pelos métodos de pincel e agulhas.

Embora seja o mais rápido e prático, o método por aspersão foi o que requereu o maior volume de inóculo e o método de inoculação por pincel foi o que necessitou menor quantidade, 500 mL e 8 mL de inóculo, respectivamente. Apesar de consumir maior quantidade de inóculo, a preparação de 500 mL de suspensão bacteriana requer menos de 10 placas de Petri com culturas de *X. citri* pv. *glycines* com 48 horas de crescimento, quantidade que não é excessiva para repicagem nem incubação.

Os resultados do nosso estudo indicam claramente que o método de inoculação por aspersão foi o melhor para reproduzir os sintomas de pústula bacteriana causada por *X. citri* pv. *glycines* sob condições ótimas de temperatura e umidade relativa. Além de seu alto potencial em causar doença e adaptabilidade para aplicabilidade em larga escala, necessária em *screenings* de programas de melhoramento (HENZ; TAKATSU; REIFSCHNEIDER, 1988; PASTOR-CORRALES; BEEBE; CORREA, 1981), o método de aspersão também simulou a condição natural de infecção de plantas em campo. As aberturas naturais como estômatos e hidatódios estão associados à multiplicidade de focos de infecção.

O método de aspersão confirmou que o patógeno é capaz de infectar e causar sintomas típicos da doença nas folhas sem necessidade de ferimentos devido à sua entrada pelas aberturas naturais. De maneira oposta, os métodos de pincel e agulhas além de causarem ferimentos nas folhas e estarem sujeitos à uma possível falsa interpretação das lesões no momento da avaliação, serem mais demorados e demandarem mais mão de obra e cautela, distribuem as células bacterianas em locais específicos da superfície foliar levando à uma distribuição menos homogênea dos sintomas na folha.

### 3.5.3 Agressividade De Isolados

A tabela 9 mostra a evolução dos sintomas de pústula bacteriana após inoculação com cinco isolados de *X. citri* pv. *glycines* (333, GDM 01, GDM 02, 87-2 e GDM 03) nas três cultivares testadas de acordo com o passar das avaliações.

A cultivar BRS 316 RR, padrão resistente, não apresentou sintomas da doença, e, por este motivo não foi adicionada a tabela. Os primeiros sintomas no experimento 1 do teste de agressividade apareceram ao quarto DAI nos genótipos NT 12 2042 e Peking, sendo que todos os isolados produziram sintomas. Na cultivar Vmax RR, os primeiros sintomas foram observados nas plantas inoculadas com o isolado 333, ao sétimo DAI, enquanto para os demais isolados não foram observados sintomas neste período. Os isolados GDM 01 e GDM 02 apresentaram sintomas na cultivar Vmax RR ao décimo DAI, enquanto os isolados 87-2 e GDM 03 apenas ao décimo terceiro DAI. O mesmo ocorreu no experimento 2, a diferença foi na cultivar Vmax RR, que começou a desenvolver sintomas ao décimo DAI para as plantas inoculadas com os isolados 333, GDM 01 e GDM 02 e ao décimo terceiro DAI com os isolados 87-2 e GDM 03.

**Tabela 9** – Severidade de pústula bacteriana em genótipos NT 12 2042, Peking e Vmax RR inoculados pelo método de aspersão com cinco isolados de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* em diferentes dias após inoculação (DAI) nos experimentos 1 e 2.

Isolado	Experimento 1					
	NT 12 2042					
	Severidade (% A. F) <sup>2</sup>					
	4 DAI <sup>1</sup>	7 DAI <sup>1</sup>	10 DAI <sup>1</sup>	13 DAI <sup>1</sup>	16 DAI <sup>1</sup>	19 DAI <sup>1</sup>
333	2,12 a	26,1 a	32,8 a	54,9 a	58,4 a	60,5 a
GDM 01	1,89 a	15,7 ab	32,7 a	47,7 a	52,8 a	54,9 a
GDM 02	1,56 ab	12,0 bc	27,4 a	42,2 a	45,2 a	47,7 a
87-2	0,66 ab	4,72 cd	6,27 b	8,29 b	9,69 b	12,2 b
GDM 03	0,13 b	0,56 d	2,53 b	4,73 b	5,54 b	6,89 b
C.V (%)	19,9	19,6	21,7	14,7	14,7	14,2

Isolados	Peking					
	Severidade (% A. F) <sup>2</sup>					
	4 DAI <sup>1</sup>	7 DAI <sup>1</sup>	10 DAI <sup>1</sup>	13 DAI	16 DAI	19 DAI
333	1,59 a	19,6 a	43,5 a	69,9 a	77,0 a	78,5 a
GDM 01	1,96 a	16,9 a	38,3 a	67,4 a	72,9 a	77,9 a
GDM 02	3,23 a	13,5 ab	34,5 a	65,5 a	69,8 a	72,0 a
87-2	0,56 a	5,03 ab	10,4 b	13,0 b	16,9 b	19,5 b
GDM 03	0,06 a	1,56 b	5,99 b	9,86 b	12,1 b	13,6 b
C.V (%)	33,7	35,1	19,4	16,4	12,4	13,2

Isolados	Vmax RR					
	Severidade (% A. F) <sup>2</sup>					
	4 DAI	7 DAI <sup>1</sup>	10 DAI <sup>1</sup>	13 DAI <sup>1</sup>	16 DAI <sup>1</sup>	19 DAI <sup>1</sup>
333	0	0,13 a	0,39 a	1,52 a	2,26 a	2,82 a
GDM 01	0	0 a	0,26 a	1,32 ab	1,99 ab	2,43 a
GDM 02	0	0 a	0,13 a	0,29 bc	1,36 abc	2,06 ab
87-2	0	0 a	0 a	0,13 c	0,59 bc	0,93 ab
GDM 03	0	0 a	0 a	0,20 c	0,26 c	0,46 b
C.V (%)	0	5,7	16,2	17,2	18,7	19,2

Isolados	Experimento 2					
	NT 12 2042					
	Severidade (% A. F) <sup>2</sup>					
	4 DAI <sup>1</sup>	7 DAI <sup>1</sup>	10 DAI <sup>1</sup>	13 DAI <sup>1</sup>	16 DAI <sup>1</sup>	19 DAI <sup>1</sup>
333	1,09 a	18,8 a	24,4 a	40,6 a	49,8 a	61,9 a
GDM 01	1,66 a	10,4 b	21,2 a	33,3 a	50,9 a	55,8 a
GDM 02	1,02 a	10,2 b	20,6 a	36,1 a	45,1 a	53,3 a
87-2	0,13 a	1,77 c	4,06 b	6,19 b	9,19 b	11,2 b
GDM 03	0,13 a	0,29 c	1,52 b	3,03 b	4,46 b	5,86 c
C.V (%)	21,5	14,8	11,5	7,9	6,7	5,9

Isolados	Peking					
	Severidade (% A. F) <sup>2</sup>					
	4 DAI <sup>1</sup>	7 DAI <sup>1</sup>	10 DAI <sup>1</sup>	13 DAI <sup>1</sup>	16 DAI	19 DAI <sup>1</sup>
333	5,16 a	13,8 a	28,4 a	44,9 a	60,2 a	73,2 a
GDM 01	2,92 ab	13,9 a	25,2 a	50,0 a	64,3 a	70,4 a
GDM 02	2,15 bc	11,1 a	21,6 a	47,4 a	59,7 a	68,7 a
87-2	0,26 d	1,95 b	6,99 b	10,5 b	13,2 b	17,3 b
GDM 03	0,39 cd	1,05 b	1,73 c	4,06 c	8,29 b	11,0 c
C.V (%)	20,2	13,6	9,1	5,9	6,6	4,2

Isolados	Vmax RR					
	Severidade (% A. F) <sup>2</sup>					
	4 DAI	7 DAI	10 DAI <sup>1</sup>	13 DAI <sup>1</sup>	16 DAI <sup>1</sup>	19 DAI <sup>1</sup>
333	0	0	0,59 a	1,46 a	2,43 a	3,09 a
GDM 01	0	0	0,13 a	0,66 a	1,46 ab	1,86 a
GDM 02	0	0	0,13 a	0,59 a	0,93 ab	1,19 a
87-2	0	0	0 a	0,26 a	0,49 b	0,86 a
GDM 03	0	0	0 a	0,26 a	0,39 b	0,79 a
C.V (%)	0	0	13,9	21,0	22,0	25,0

<sup>1</sup>Medias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Medias originais, para análise os dados foram transformados por  $\sqrt{x + 1}$ .

<sup>2</sup>% A. F: porcentagem de área foliar afetada.

Na penúltima avaliação, ao décimo sexto DAI, algumas plantas apresentaram abortamento de folhas, ocasionado pela alta severidade da doença, principalmente nas plantas inoculadas com os isolados 333, GDM 01 e GDM 02, havendo maior queda de folhas na cultivar Peking, demonstrando ser altamente suscetível à doença. O genótipo NT 12 2042 também apresentou abortamento, porém em menor quantidade que a Peking. A cultivar Vmax RR não apresentou queda de folhas.

A doença evoluiu de forma rápida nos primeiros dias após a inoculação nos dois experimentos nos genótipos NT 12 2042 e Peking, aumentando de forma exponencial até aproximadamente o décimo terceiro DAI. Após esse período, a doença continuou aumentando, porém em menor quantidade. Na cultivar Vmax RR, não houve grande expressão dos sintomas para nenhum dos isolados testados.

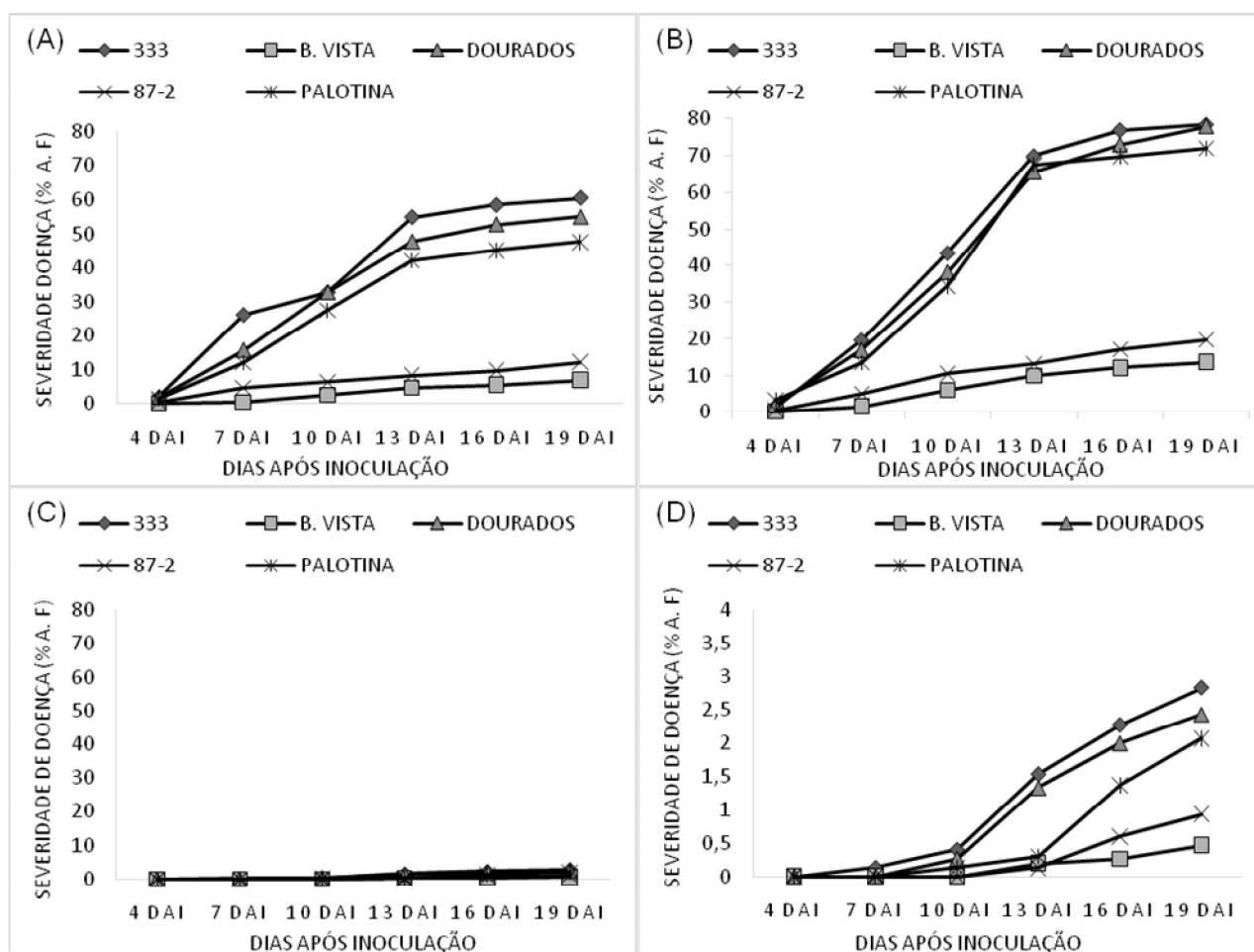
A severidade final da doença, no décimo nono DAI, mostrou diferença significativa entre os isolados testados para alguns genótipos em ambos os experimentos. No experimento 1, os genótipos NT 12 2042, Peking e Vmax RR apresentaram diferenças significativas entre a severidade dos isolados. Na linhagem NT 12 2042, os isolados 333, GDM 01 e GDM 02 com severidades de 60,5; 54,9 e 47,6%, respectivamente, não diferiram significativamente entre si, mas diferiram dos isolados 87-2 e GDM 03, com severidades de 12,1 e 6,8%, respectivamente. Entre esses dois isolados, não houve diferença significativa. Para a cultivar Peking ocorreu o mesmo que constatado para NT 12 2042, apresentando diferenças somente nos valores de severidade, que foi a maior entre as cultivares. A cultivar Vmax RR apresentou diferença significativa somente para os isolados 333 e GDM 03.

O genótipo NT 12 2042, no experimento 2, também não demonstrou diferença entre os isolados 333, GDM 01 e GDM 02, que chegaram a severidades de 61,9; 55,8 e 53,3%, respectivamente, e estes diferiram dos isolados 87-2 e GDM 03, que

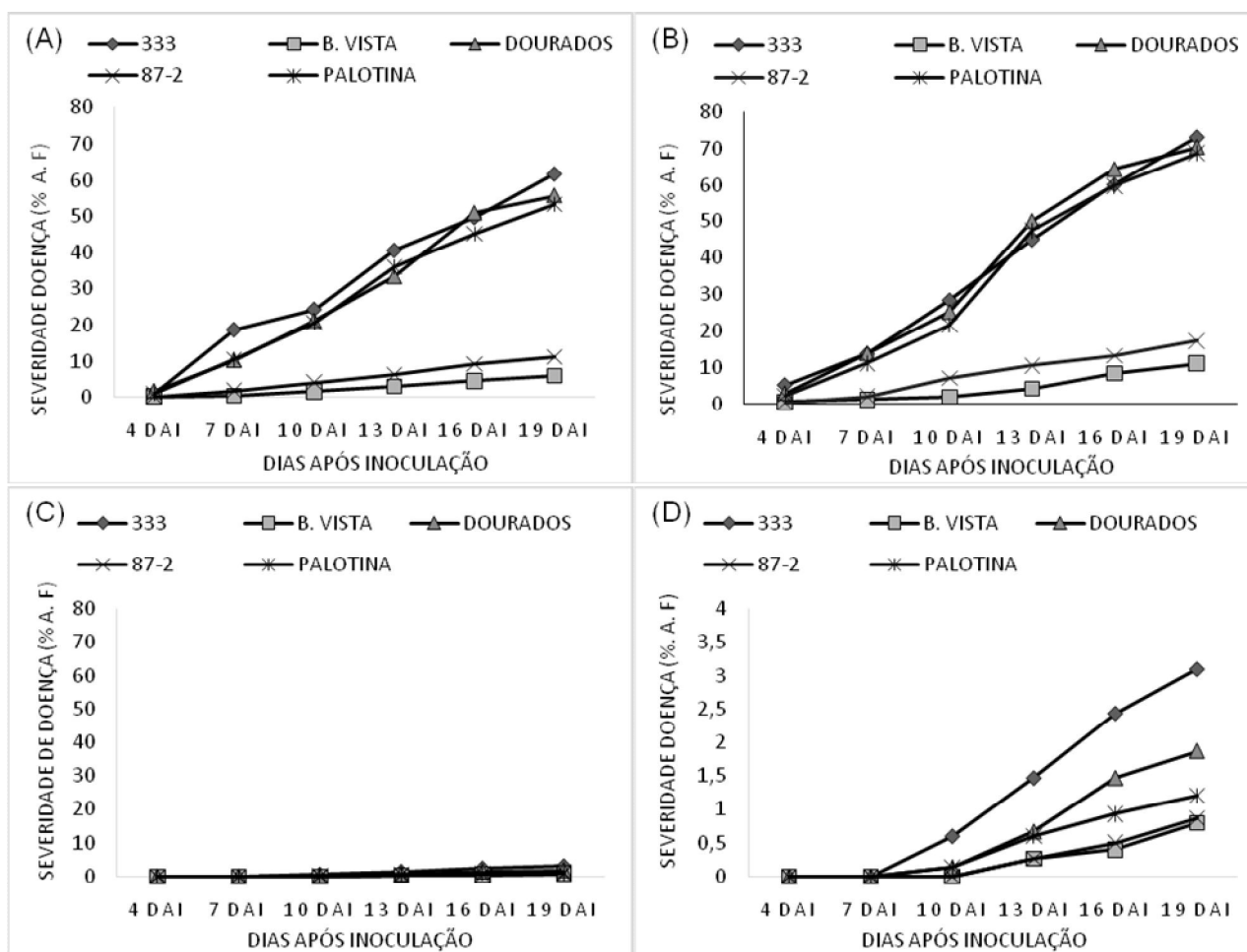
diferentemente do experimento 1, diferiram entre si, com severidades de 11,2 e 5,86%, respectivamente. A cultivar Vmax RR não apresentou diferenças significativas entre nenhum dos isolados e foi o genótipo que apresentou os menores valores de severidade em ambos os experimentos.

A curva de progresso da doença para os cinco isolados testados está exposta nas figuras 4 e 5.

**Figura 4** – Curva de progresso da doença para os diferentes isolados de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* avaliados durante 19 dias e inoculados pelo método de aspersão nos genótipos (A) NT 12 2042, (B) Peking, (C) Vmax RR e (D) Vmax RR com escala do eixo y modificada (máximo de 4% de severidade) no experimento 1.



**Figura 5** – Curva de progresso da doença para os diferentes isolados de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* avaliados durante 19 dias e inoculados pelo método de aspersão nos genótipos (A) NT 12 2042, (B) Peking, (C) Vmax RR e (D) Vmax RR com escala do eixo y modificada (máximo de 4% de severidade) no experimento 2.



Com os gráficos da curva de progresso da doença é possível notar a diferença entre a severidade da doença para os isolados 333, GDM 01 e GDM 02, em relação aos isolados 87-2 e GDM 03 nos genótipos NT 12 2042 e Peking. O isolado 333 foi o mais agressivo para todos os genótipos de soja avaliados e ao contrário, o isolado GDM 03 foi o menos agressivo.

A AACPD também mostrou diferenças significativas entre os isolados (Tabela 11). Não houve diferenças significativas entre os isolados 333, GDM 01 e GDM 02 nos genótipos NT 12 e Peking, sendo que para esses isolados a AACPD foi

maior. Estes diferiram apenas dos isolados 87-2 e GDM 03, sendo que estes dois não diferiram significativamente entre si, em ambos os experimentos. A cultivar Vmax RR foi a que apresentou os menores valores de severidade e conseqüentemente de AACPD. Para esta cultivar, houve diferença estatística somente entre os isolados 333 e 87-2 e 333 e GDM 03, para ambos os experimentos.

**Tabela 10** – Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) nos genótipos NT 12 2042, Peking e Vmax RR inoculados pelo método de aspersão com cinco isolados de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* nos experimentos 1 e 2.

Isolado	Experimento 1		
	NT 12 2042 <sup>1</sup>	PEKING	VMAX RR <sup>1</sup>
333	31,9 a	39,6 a	0,90 a
GDM 01	28,1 a	37,1 a	0,75 ab
GDM 02	24,0 a	35,5 a	0,44 abc
87-2	5,66 b	8,82 b	0,18 bc
GDM 03	2,67 b	5,74 b	0,11 c
C.V (%)	14,1	18,8	11,3
Isolados	Experimento 2		
	NT 12	PEKING	VMAX RR <sup>1</sup>
333	26,1 a	30,3 a	0,95 a
GDM 01	22,9 a	29,9 a	0,50 ab
GDM 02	22,1 a	27,8 a	0,37 ab
87-2	4,26 b	6,54 b	0,18 b
GDM 03	1,95 b	3,33 b	0,16 b
C.V (%)	15,8	11,1	12,9

<sup>1</sup>Medias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Medias originais, para análise os dados foram transformados por  $\sqrt{x+1}$ .

Os resultados indicaram a existência de variabilidade na agressividade dos isolados quando inoculados nos genótipos NT 12 2042, Peking e Vmax RR no primeiro experimento, e ausência de variabilidade na cultivar Vmax RR no segundo. Os resultados indicam a necessidade de considerar a variabilidade do patógeno na avaliação de genótipos de soja em programas de seleção de cultivares resistentes. O uso de isolados mais agressivos é desejável, pois proporciona mais rigor na seleção e melhor discernimento entre genótipos resistentes e suscetíveis (NAKATANI; LOPES; CAMARGO, 2009). Kaewnum, Prathuangwong e Burr (2005)

também constataram diferença significativa na severidade de diferentes isolados de *X. citri* pv. *glycines* e concluíram que a origem geográfica dos isolados não parece estar relacionada com sua agressividade. Zinsou et al. (2015) e Park et al. (2008) relataram variabilidade significativa na virulência de isolados de *X. citri* pv. *glycines*. Park et al. (2008) concluíram que possivelmente genes homólogos ao *avrBs3* influenciam na patogenicidade de *X. citri* pv. *glycines* em cultivares de soja.

Em estudo realizado por Athinuwat et al. (2009) na Tailândia, isolados foram monitorados quanto à sua virulência diferencial em diferentes cultivares. Essa virulência é determinada pelo gene *avrBs3* homólogo ao *avrXg1*. De acordo com a patogenicidade expressa nas plantas, os autores chegaram a identificar três raças: raça 1, a qual induziu respostas de hipersensibilidade, raça 2, a qual causou doença nas três cultivares e raça 3, a qual induziu resposta de hipersensibilidade na cultivar resistente e causou doença nas cultivares suscetíveis. Os autores concluíram que para as três diferentes raças encontradas houve uma resposta diferente do gene *avrXg1*. Desta maneira, mostram que existem multifunções para este gene, dependendo do isolado do patógeno e das origens genéticas das plantas.

#### 3.5.4 Caracterização de Cultivares

Entre as 18 cultivares, incluindo os padrões suscetível e resistente, avaliadas no experimento de caracterização, 11 delas apresentaram sintomas de pústula bacteriana. A maior porcentagem de área foliar afetada foi no padrão suscetível, NT 12 2042. Entre as cultivares comerciais escolhidas para o estudo, a que apresentou maior severidade, sem considerar o padrão suscetível, foi a cultivar SYN 1561. As cultivares resistentes BRS 316 RR, M 6210 IPRO, TMG 2286 IPRO, DM 81184 IPRO e Domínio IPRO não apresentaram nenhum sintoma de pústula bacteriana quando inoculadas com os métodos testados, confirmando sua resistência à doença. Dessa maneira, todos estes diferiram estatisticamente das demais cultivares, que expressaram algum grau de severidade da doença. A Tabela 12 mostra os valores de severidade de pústula bacteriana obtidos no experimento de caracterização de cultivares, inoculadas utilizando os métodos de aspersão e pincel.

**Tabela 11** – Caracterização da reação de cultivares em resposta à inoculação com o isoaldo 333 de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* utilizando os métodos de aspersão e pincel em condições de casa-de-vegetação. Avaliação 16º dia após inoculação (DAI).

Cultivar	Experimento 1		
	Reação registrada <sup>1</sup>	Aspersão (% A. F.) <sup>2,3</sup>	Pincel (nota MAPA) <sup>4</sup>
NT 12 2042	S (padrão)	45,7 a	S
SYN 1561 IPRO	S	22,3 b	S
NEO 530 IPRO	MS	15,3 c	S
TABARANA	S	14,3 cd	S
ZEUS IPRO	MS	10,3 d	S
M 8349 IPRO	MR	3,0 e	MR
FOCO IPRO	MR	2,83 e	MR
BRS 184	MR	2,66 e	MR
NA 7337 RR	MR	1,50 e	MR
M 6410 IPRO	MR	1,50 e	MR
M 7739 IPRO	MR	1,33 e	MR
M 6210 IPRO	R	0 f	R
TMG 2286 IPRO	R	0 f	R
DM 81184 IPRO	R	0 f	R
DOMÍNIO IPRO	R	0 f	R
BR-4	S	0 f	S
DESAFIO RR	S	0 f	S
BRS 316 RR	R (padrão)	0 f	R
C.V (%)	11,1		

Cultivar	Experimento 2		
	Reação registrada <sup>1</sup>	Aspersão (% A. F.) <sup>2,3</sup>	Pincel (escala MAPA) <sup>4</sup>
NT 12 2042	S (padrão)	38,8 a	S
SYN 1561 IPRO	S	24,8 b	S
NEO 530 IPRO	MS	21,8 b	S
TABARANA	S	10,8 c	S
ZEUS IPRO	MS	6,66 cd	S
FOCO IPRO	MR	4,66 de	MR
BRS 184	MR	3,66 de	MR
M 8349 IPRO	MR	2,83 ef	MR
M 7739 IPRO	MR	2,33 ef	MR
NA 7337 RR	MR	2,33 ef	MR
M 6410 IPRO	MR	0,83 f	MR
M 6210 IPRO	R	0 g	R
TMG 2286 IPRO	R	0 g	R
DM 81184 IPRO	R	0 g	R
DOMÍNIO IPRO	R	0 g	R
BR-4	S	0 g	S

DESAFIO RR	S	0 g	S
BRS 316 RR	R (padrão)	0 g	R
C.V.(%)	14,8		

Medias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<sup>1</sup> Reação retirada do registro de reações a doenças disponibilizado pelas empresas detentoras das cultivares sendo S: suscetível, MS: moderadamente suscetível, MR: moderadamente resistente e R: resistente.

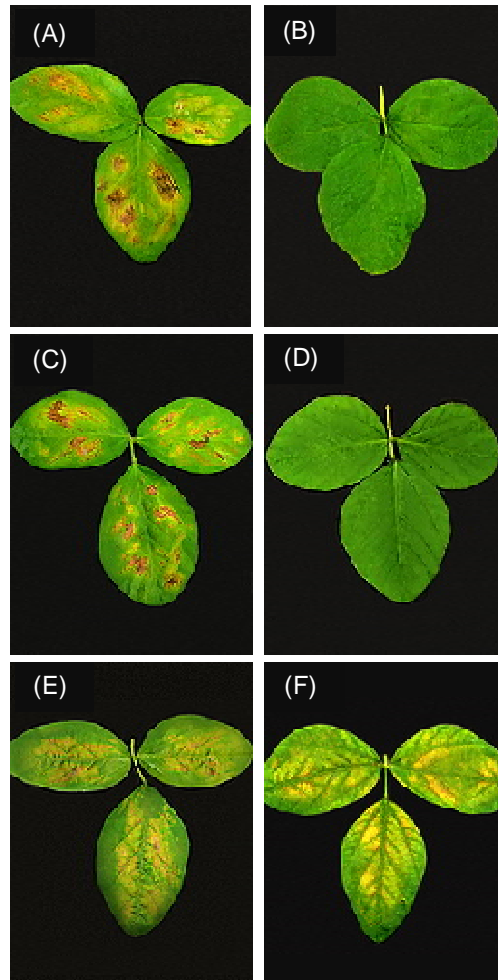
<sup>2</sup> Medias originais, para análise os dados foram transformados por  $\sqrt{x}$ .

<sup>3</sup> % A. F: porcentagem de área foliar afetada.

<sup>4</sup> Escala de avaliação proposta pelo MAPA (2007) onde S (suscetível): muitas lesões; MR (moderadamente resistente): poucas lesões e R (resistente): sem lesões.

Aproximadamente cerca de 88,8% das cultivares testadas apresentaram reações iguais ao registro de reação à pústula bacteriana, além de também demonstrarem relação entre os sintomas desenvolvidos com a inoculação com método do pincel como pelo método de aspersão. As diferenças nas reações entre os métodos de inoculação foram constatadas para as cultivares BR-4 e Desafio RR. Com a utilização da técnica do pincel, as cultivares mostraram reação de suscetibilidade, quando comparada ao padrão suscetível NT 12 2042, apresentando muitas lesões, avaliadas como S, conforme sugere a escala proposta pelo MAPA (2007). Já para o método de aspersão, as cultivares expressaram reações de resistência, não apresentando nenhum sintoma típico da doença (figura 6).

**Figura 3** – Comparação das reações dos genótipos BR-4, Desafio RR e NT 12 2042 (padrão suscetível) inoculadas com *Xanthomonas citri* pv. *glycines* pelos métodos de pincel e aspersão. Figura (A) Cultivar BR-4 inoculada pelo método do pincel, (B) Cultivar BR-4 inoculada pelo método de aspersão, (C) Cultivar Desafio RR inoculada pelo método do pincel, (D) Cultivar Desafio RR inoculada pelo método de aspersão, (E) NT 12 2042 inoculada pelo método do pincel e (F) NT 12 2042 inoculada pelo método de aspersão.



Fonte: o próprio autor, 2020.

De acordo com Robeson et al. 1989, metodologias que requerem ferimentos nos tecidos do hospedeiro podem anular algumas respostas de resistência das plantas frente aos fitopatógenos. Dessa maneira, cultivares resistentes que possuem algum fator estrutural que impede a entrada de bactéria no tecido, como a morfologia da crista cuticular junto ao ostíolo do estômato, por exemplo, teria seu efeito anulado por métodos que causam ferimentos e injúrias no tecido da planta que convertem-se em portas de entrada para a bactéria.

*Screenings* para caracterização de cultivares buscando resistência à pústula bacteriana são realizados em programas de melhoramento visando a obtenção de cultivares resistentes, visto que de acordo com nosso estudo, a severidade pode chegar a 78% de área foliar afetada em cultivares suscetíveis, o que causaria grandes perdas de produtividade.

Diante disso, embora seja uma doença preocupante no quesito perdas de produção, a resistência à doença não vem sendo um dos objetivos principais nos programas de melhoramento. De acordo com Soares e Arias (2016), a diminuição do número de cultivares resistentes à pústula bacteriana está relacionada às mudanças ocorridas no sistema de produção que envolve a cultura da soja. Dentre elas, destacam o surgimento de cultivares geneticamente modificadas como as resistentes à lagartas e a soja resistente aos herbicidas do grupo das imidazolinonas.

Segundo Gorardia et al. (2009) há também a possibilidade de que o genótipo de resistência à pústula bacteriana não esteja sendo mantido como objetivo de seleção durante o desenvolvimento de cultivares comerciais tolerantes ao glifosato. Uma possibilidade mencionada é que no processo de desenvolvimento de cultivares de soja transgênica, o gene *rxp*, bem como outros genes de resistência, podem ser perdidos ou um alelo suscetível introduzido, isso, por sua vez, aumentaria o nível de suscetibilidade à pústula bacteriana em cultivares de soja.

Outro fator que pode ser considerado é de que, devido à durabilidade e à simplicidade do uso do gene de resistência *rxp*, não tem havido buscas de outras fontes de resistência para a doença (VERNETTI; VERNETTI JUNIOR, 2009).

### 3.6 CONCLUSÕES GERAIS

O método de inoculação de *X. citri* pv. *glycines* que se mostra mais rápido, prático, que mimetizou os sintomas da doença em condições naturais de campo e que possibilitou avaliar quantitativamente a doença é o método de aspersão. As melhores condições de inoculação por aspersão que otimizam a expressão dos sintomas de pústula bacteriana são: estágio da planta de soja no momento da inoculação V3 (aproximadamente 20 DAS nas condições dos experimentos), inoculação com concentração de inóculo de aproximadamente  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> e utilização de 24 horas de câmara úmida pré e pós inoculação.

Os testes de agressividade mostram diferenças significativas entre os isolados quando inoculados nos genótipos NT 12 2042 e Peking. Os isolados de *X. citri* pv. *glycines* que apresentam maior severidade de pústula bacteriana são 333,

GDM 01 e GDM 02, enquanto os isolados 87-2 e GDM 03 são os menos agressivos. Esses resultados mostram a necessidade de considerar a variabilidade do patógeno na avaliação de genótipos de soja em programas de seleção, visto que isolados mais agressivos proporcionam mais rigor na seleção e melhor discernimento entre genótipos resistentes e suscetíveis.

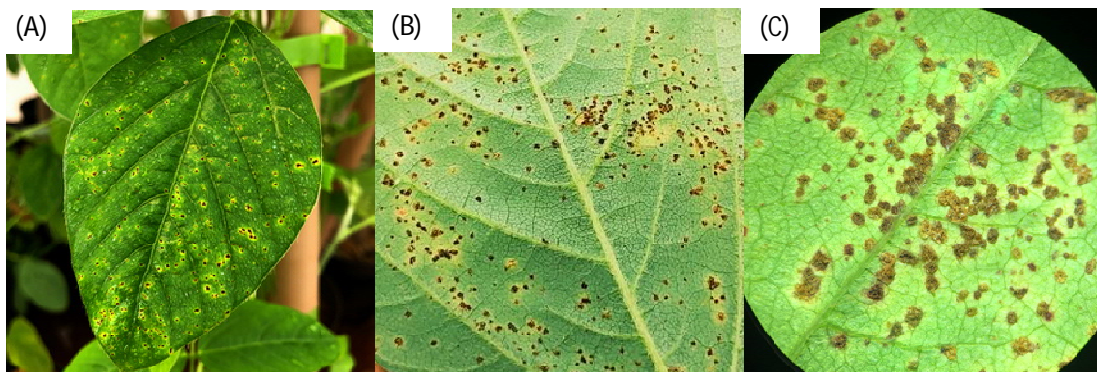
De acordo com os experimentos de caracterização de cultivares, pode-se concluir que o método do pincel pode superestimar os sintomas da doença em alguns genótipos, resultando em diferenças na reação à pústula bacteriana quando comparado ao método de aspersão. Além de que os sintomas obtidos pelo método do pincel não se parecerem aos sintomas da doença em ocorrência natural. Esta técnica causa importantes injúrias no limbo foliar, podendo estar suprimindo respostas de defesa baseadas em resistência estrutural.

## 4 PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO ARTIFICIAL DE *Xanthomonas citri* pv. *glycines* PARA SCREENING DE GENÓTIPOS DE SOJA EM CASA DE VEGETAÇÃO

### 4.1 INTRODUÇÃO

*Xanthomonas citri* pv. *glycines* é uma bactéria gram-negativa causadora da doença pústula bacteriana em soja. Os sintomas da doença ocorrem tipicamente nas folhas, caracterizados por manchas que possuem coloração parda, com formato arredondado e nunca angulares (Figura 7). No centro da lesão, observa-se uma pequena elevação, chamada de pústula, que dá nome à doença (GODOY et al., 2014). Essas pústulas geralmente ocorrem na parte inferior da folha (JONES; FETT, 1987). Com a evolução da doença no limbo foliar, as manchas aumentam de tamanho. Em ataques mais severos, o número de lesões aumenta, as quais coalescem e tornam a superfície da folha quase totalmente necrosada (FERREIRA; LEHAM; ALMEIDA, 1979).

**Figura 4** – Sintomas característicos de pústula bacteriana causada por *Xanthomonas citri* pv. *glycines* em plantas de soja inoculadas artificialmente pelo método de aspersão. (A) folha com sintomas característicos em casa de vegetação na face adaxial do folíolo, (B) pústulas bacterianas na face abaxial do folíolo e (C) visualização em lupa das pústulas bacterianas na face abaxial do folíolo.



Fonte: BERTOGLIO, 2020.

O patógeno é transmissível pelas sementes, embora sementes infectadas não apresentem diferença com as sadias. A sobrevivência na semente pode variar de 6

a 7 meses (DANELLI; BIANCHIN, 2012). Os restos culturais são outra fonte de inóculo para as plantas jovens. A semente e os restos culturais infectados dão origem às infecções primárias (FERREIRA; LEHAM; ALMEIDA, 1979). As gotas de chuva removem as células bacterianas da folha e as carregam para outras plantas a curtas distâncias (DANELLI; BIANCHIN, 2012). As infecções secundárias são favorecidas por chuva e vento, sob condições de alta umidade e temperatura (30-33°C) (HENNING et al., 2014).

A pústula bacteriana causa, em alta severidade, desfolha precoce, reduzindo o peso e o número de grãos, com reflexo no rendimento (HARTWIG; JOHNSON, 1953). Em condições de alta incidência e severidade, já foram relatadas perdas na produtividade de 12% a 40% (SHARMA; NAIR; PAWAR, 1993; FERREIRA et al., 1979).

A incorporação de resistência em cultivares de soja é um dos métodos de controle mais eficientes. No Brasil, grande parte das cultivares comerciais de soja apresentam resistência à pústula bacteriana (LANNA FILHO, 2015). Porém, Soares e Arias (2016) em levantamento de linhagens de soja com resistência à doenças observaram o decréscimo do número de cultivares resistentes à pústula bacteriana a partir de 2011.

## 4.2 METODOLOGIA

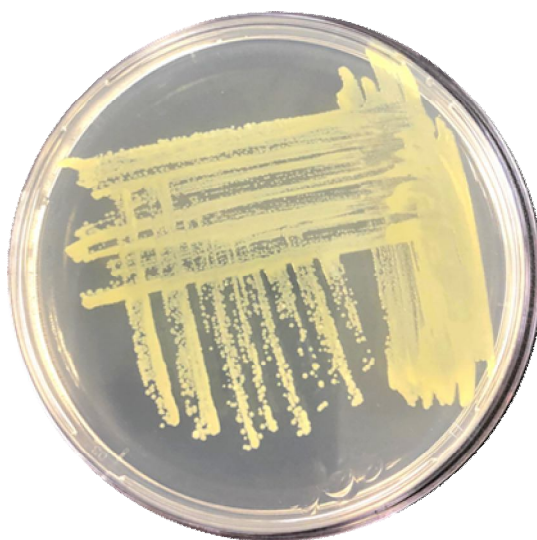
Para a inoculação de plantas de soja com a bactéria e obtenção de sintomas da pústula bacteriana, condições controladas/semi-controladas são indispensáveis. Temperaturas entre 28 e 30°C e umidade relativa aproximada de 80% são requisitos para que ocorra a infecção.

As plantas devem ser cultivadas em vasos de 1 litro, sendo semeadas 10 sementes por vaso com desbaste aos 10 dias após a semeadura, deixando 3 plantas por vaso. Deve-se utilizar nos ensaios um padrão de resistência (ex. cultivar BRS 316 RR) e um padrão de suscetibilidade (ex. cultivar Peking).

Em relação ao isolado bacteriano de *Xanthomonas citri* pv. *glycines*, deve-se utilizar o isolado 333 (J. Rodrigues Neto, 1981 – Coleção do Instituto Biológico de São Paulo). O armazenamento do inóculo bacteriano deve ser feito em tampão fosfato (1,5g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1000 mL água destilada, ph 7). Para

reativação do isolado bacteriano, recomenda-se a retirada de alíquotas do tampão contendo o inóculo e a repicagem em meio Ágar Nutriente - AN (5g peptona, 3g extrato de carne, 15g ágar, 1000 mL água destilada). As placas de petri devem ser invertidas e mantidas a 28°C por 48 horas. As colônias de *X. citri* pv. *glycines* (Figura 8) em meio AN são principalmente circulares, achatadas, brilhantes, ligeiramente salientes, convexas e de coloração amarela a amarela brilhante (LAMBANI; JAHAGIRDAR, 2017).

**Figura 5** - Colônias características de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* crescidas em meio Ágar Nutriente por 48 horas a 28°C.



Fonte: BERTOGLIO, 2020.

Após 48 h de crescimento a 28°C, as colônias devem ser repicadas para novas placas de petri contendo meio AN, deixando em crescimento por mais 48 h a 28°C para preparação da suspensão bacteriana. A suspensão deve ser preparada em água destilada esterilizada e calibrada em espectrofotômetro a D.O: 600 nm = 0,2 o que correspondendo a aproximadamente  $10^8$  unidades formadoras de colônia por mL (UFC mL<sup>-1</sup>). Para cálculo do ajuste da suspensão deve ser utilizada a equação abaixo:

$$V_1.C_1 = V_2.C_2$$

Onde:  $V_1$ : volume inicial;  $C_1$ : concentração inicial;  $V_2$ : volume final e  $C_2$  concentração final.

Para 1 L são utilizadas aproximadamente 14 placas de petri com crescimento sobre toda superfície do meio de cultura.

As plantas devem ser inoculadas no estágio V3 (aproximadamente aos 20 dias após a semeadura). Antecedendo a inoculação, é indispensável a realização de câmara úmida por 24 horas para favorecer a abertura estomática.

Para montagem da câmara úmida que acomode muitas plantas, deve-se colocar as plantas em bandejas de metal de aproximadamente 3 x1 m, com arcos de aproximadamente 70 cm de altura, o que facilita a cobertura de todas as plantas com plástico transparente. As bandejas devem ser preenchidas com água até metade de seu volume com a finalidade de manter a umidade.

Para a inoculação da suspensão bacteriana nas plantas de soja, borrifadores manuais que permitem a regulação das gotículas devem ser utilizados. O borrifador deve ser mantido a aproximadamente 2 cm de distância dos folíolos, para que a pressão ajude na penetração da bactéria e que a pressão esteja regulada a fim de não causar injúria nos tecidos foliares. Para a inoculação de 100 plantas são necessárias aproximadamente 30 placas de petri com crescimento da bactéria por toda extensão da placa, levando cerca de 17 minutos para inocular esse mesmo número de plantas. A inoculação por aspersão deve ser feita até o ponto de escorrimento.

Após a inoculação, deve-se instalar novamente a câmara úmida por mais 24 horas. Após esse período, é necessário manter nebulização automática ou manual a cada 20 minutos com o objetivo de manter a umidade do local em pelo menos 80%. A temperatura após inoculação deve permanecer entre 28 e 30°C. Temperatura e umidade recomendadas devem ser mantidas até o final da avaliação das plantas.

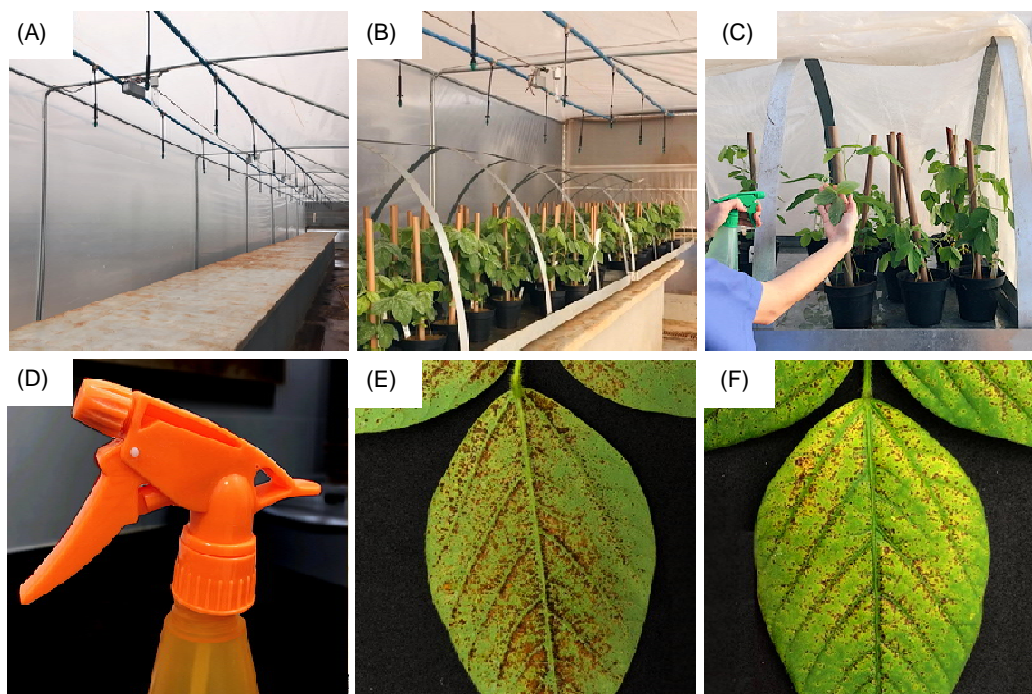
A avaliação da severidade da pústula bacteriana deve ser realizada visualmente pela porcentagem de área foliar afetada (% A. F.), a partir do

aparecimento dos primeiros sintomas nas plantas de soja da cultivar suscetível (padrão). Normalmente isto ocorre a partir dos 15 dias após a inoculação.

Detalhes do experimento como local, material utilizado para o método de aspersão e sintomas no momento da avaliação são observados na figura 9.

O método de inoculação por aspersão mostra-se prático, rápido, não injurioso as plantas e promove sintomas característicos da doença, simulando a infecção natural em campo, sendo, portanto, recomendado para *screening* de genótipos de soja em casa de vegetação.

**Figura 6** – Detalhes do local da realização do experimento, material utilizado e sintomas da doença no momento da avaliação. (A) casa de vegetação com condições controladas de temperatura e umidade relativa, com detalhe para a utilização de aspersores os quais mantém a umidade em aproximadamente 80%; (B) plantas dentro de bandejas as quais são cobertas com lona plástica transparente; (C) inoculação por aspersão; (D) borrifador utilizado para inoculação por aspersão; (E) sintomas de pústula bacteriana no padrão suscetível sugerido (Peking) aos 15 dias após inoculação na face abaxial; e (F) na face adaxial da folha.



Fonte: BERTOGLIO, 2020.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRIOS, G. N. Losses caused by plant diseases. **Plant Pathology**. Elsevier, p. 29-45, 2004.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN-FILHO, A. B. Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos. **São Paulo: Agronômica Ceres**, p. 424-450, 2018.
- ANDRADE, F. A.; GONÇALVES, L. S.; FUKUJI, A.; MIGLIORANZA, É.; TAKAHASHI, L. S.; BALBI-PEÑA, M. I.; RODRIGUES, R. Snap beans for organic farming and evaluation of resistance to the common bacterial blight. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 385-389, 2017.
- ANDRUS, C. F. A methods of testing for resistance to bacterial blight. **Phytopathology**, v.38, p. 757-759, 1948.
- ATHINUWAT, D.; BROOKS, S., BURR, T. J., PRATHUANGWONG, S. Flagella and Pili of *Xanthomonas citri* pv. *glycines* are associated with motility, biofilm formation and virulence on soybean. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 7-8, p. 590-600, 2018.
- ATHINUWAT, D.; PRATHUANGWONG, S.; CURSINO, L.; BURR, T. *Xanthomonas citri* pv. *glycines* soybean cultivar virulence specificity is determined by avrBs3 homolog avrXg1. **Phytopathology**, v. 99, n. 8, p. 996-1004, 2009.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. **Phytopathology**, v. 89, n. 5, p. 353-359, 1999.
- BEDENDO, I. P; BELASQUE, J. Bactérias Fitopatogênicas. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**, v. 1, p. 143-160, 2018.
- BONALDO, S.M.; RIEDO, I.C.; LIMA, A.R. Monitoramento e diagnóstico de doenças foliares da cultura da soja na região da COMCAM na safra de 2007/2008. **Campo Digital**, Campo Mourão, v.4, n.1, p.127-136, 2009.
- BORGES NETO, C. R.; GORGATI, C. Q.; PITELLI, R. A. Influência da concentração de inóculo e da idade da planta na intensidade de doença causada por *Fusarium graminearum* em *Egeria densa* e *E. najas*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 282-288, 2004.
- BORGES, M. F.; RESENDE, M. L. V.; VON PINHO, R. G. Inoculação artificial de colmos de milho em diferentes idades e concentrações de inóculo e sua relação com a expressão da resistência a *Fusarium moniliforme*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 715-720, 2001.
- CAMERA, J. N.; DEUNER, C. C.; REIS, E. M. Diferentes concentrações do inóculo de *Cercospora sojina* na intensidade da mancha foliar "olho-de-rã" em soja. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 3, p. 235-238, 2012.

- CARNEGIE, S. F.; COLHOUN, J. Susceptibility of potato leaves to *Phytophthora infestans* in relation to plant age and leaf position. **Journal of Phytopathology**, v. 104, n. 2, p. 157-167, 1982.
- CARPENTER, S. C. D.; KLADSUWAN, L.; HAN, S. W.; PRATHUANGWONG, S.; BOGDANOVA, A. J. Complete Genome Sequences of *Xanthomonas citri* pv. *glycines* Isolates from the United States and Thailand Reveal Conserved Transcription Activator-Like Effectors, **Genome Biology and Evolution**, v. 11, p. 1380-1384, 2019.
- CHATNAPARAT, T.; PRATHUANGWONG, S.; LINDOW, S.E. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas citri* pv. *glycines* within soybean leaves. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.29, n.6, p. 508-522, 2016.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. Disponível em <<https://www.conab.gov.br/>> Acesso em: 03/05/2020.
- CONSTANTIN, E. C.; CLEENWERCK, I.; MAES, M.; BAEYEN, S.; VAN MALDERGHEM, C.; DE VOS, P.; COTTYN, B. Genetic characterization of strains named as *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* leads to a taxonomic revision of the *X. axonopodis* species complex. **Plant Pathology**, v. 65, n. 5, p. 792-806, 2016.
- DANELLI, A.L.D.; BIANCHIN, V. Pústula bacteriana. In: Reis, E.M.; Casa, R.T.; **Doenças da soja**. Berthier, p.63-66, 2012.
- EDDIN, K.S.; MARIMUTHU, T.; LADHALAKSHMI, D.; RABINDRAN, R.; VELAZHAHAN, R. A simple inoculation technique for evaluation of cotton genotypes for resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v.112, n.4, p. 321-328, 2005.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Tecnologias de produção de soja** – Região Central do Brasil 2012 e 2013. Londrina, PR: Embrapa Soja, p. 264, 2011.
- FEASTER, C. V. Bacterial pustule disease in soybeans: artificial inoculation, varietal resistance, and inheritance of resistance. Universidade de Missouri. **Agricultural Experiment Station**. 26 p. 1951.
- FERNANDES, C.D.; DEL PELOSO, M.C.; MAFFIA, L.A.; DO VALLE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. Influência da concentração de inóculo de *Cercospora coffeicola* e do período de molhamento foliar na intensidade da cercosporiose do cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Lavras, v. 16, p. 39-43, 1991.
- FERREIRA, L. P.; LEHAM, P. S.; ALMEIDA, A. M. R. **Doenças da Soja no Brasil**. Londrina, PR: Embrapa, p. 48, 1979.
- FRY, W. E. Quantification of general resistance of potato cultivars and fungicide effects for integrated control of potato late blight. **Phytopathology**, v. 68, n. 11, p. 1650-1655, 1978.
- FURTADO, G. Q.; ALVES, S. A. M.; CARNEIRO, L. C.; GODOY, C. V.; MASSOLA JÚNIOR, N. S. Influência do estágio fenológico e da idade dos trifólios de soja na *Phakopsora pachyrhizi*. **Tropical plant pathology**, p infecção de. 118-122, 2009.

GODOY, C.; ALMEIDA, A. M. R.; SOARES R. M.; SEIXAS C. D. S.; DIAS W. P.; MEYER M. C.; COSTAMILAN L. M.; HENNING A. A. Doenças da Soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Embrapa Soja**. p. 32, 2014. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/125697/1/DoencasdaSoja.pdf>> Acesso em: 08/05/2019.

GOODMAN, R. N.; KIRALY, A.; WOOD, K. E. The biochemistry and physiology of plant disease. **Columbia: University of Missouri**, 433 p., 1986.

GORADIA, Lopa; HARTMAN, Glen L.; DANIEL, Steven L. Evaluation of glyphosate-tolerant soybean cultivars for resistance to bacterial pustule. **European journal of plant pathology**, v. 124, n. 2, p. 331-335, 2009.

GRAHAM, J. H.; GOTTWALD, T. R.; RILEY, T. D.; ACHOR, D. Penetration through leaf stomata and growth of strains of *Xanthomonas campestris* in citrus cultivars varying in susceptibility to bacterial diseases. **Phytopathology**, v. 82, n. 11, p. 1319-1325, 1992.

GROTH, D. E. Bacterial pustule of soybeans: Pathogen growth kinetics and epidemiology. Tese (Doutor em Fitopatologia), **Iowa State University**, Iowa. 1983.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999.

HAN, S.W.; CHOI, M.S; LEE, S.H; HWANG, D.; HWANG, B.K.; HEU, S. Characterization of a novel necrotic response of *Glycine max* line 'PI966188' to *Xanthomonas citri* pv. *glycines*. **Plant Pathology**, v.23, n.3, p. 193-202, 2007.

HARTWIG, E.E.; LEHMAN, S.G. Inheritance of resistance to the bacterial pustule disease in soybeans. **Agronomy Journal**, v.43, p.226-229, 1951.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. 4. ed. Londrina, PR: Embrapa Soja, p. 74, 2009.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. Manual de identificação de doenças de soja. **Embrapa Soja**, ed.5, 2014.

HENZ, G. P.; TAKATSU, A.; REIFSCHEIDER, F. J. B. Avaliação de métodos de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* para detecção de fontes de resistência em brássicas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.13, n.3, p.207-210, 1988.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, v. 24, n.4, p.408-421, 1970.

ITO, M. F. Principais doenças da cultura da soja e manejo integrado. **Nucleus**, v. 10, n. 3, p. 83-101, 2013.

- JONES, S. B.; FETT, W. F. Bacterial pustule disease of soybean: Microscopy of pustule development in a susceptible cultivar. **Phytopathology**, v. 77, n. 2, p. 266-274, 1987.
- JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. **Mammalian protein metabolism**, v. 3, p. 21-132, 1969.
- KAEWNUM, S.; PRATHUANGWONG, S.; BURR, T.J. Aggressiveness of *Xanthomonas citri* pv. *glycines* isolates to soybean and hypersensitivity responses by other plants. **Plant Pathology**, v.54, p.409-415, 2005.
- KENDRICK JR, J. Predisposition of tomato to bacterial canker. **Journal of Agricultural Research**, v. 77, n. 6, p. 169, 1948.
- KHAERUNI, A.; JOHAN, E. A.; WIJAYANTO, T.; TAUFIK, M.; SYAFAR, A. A. R.; SUTARIATI, G. K. Induction of soybean resistance to bacterial pustule disease (*Xanthomonas citri* pv. *glycines*) by rhizobacteria and organic material treatment. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, p. 12-52, 2018.
- KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547-1549, 2018.
- LAMBANI, K.; JAHAGIRDAR, S. Morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics of bacterial pustule of soybean caused by *Xanthomonas citri* pv. *glycines*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 1155-1159, 2017.
- LANNA FILHO, R. Fitobactérias na cultura da soja. In: Lemes, E.; Castro, L.; Assis, R. Doenças da soja: melhoramento genético e técnicas de manejo. Campinas: **Millennium**, p. 81-92, 2015.
- LAVIOLETTE, F. A.; ATHOW, K. L.; PROBST, A. H.; WILCOX, J. R. Effect of bacterial pustule on yield of soybeans. **Crop Science**, v. 10, p. 150-151, 1970.
- LI, L.; STEFFENS, J. C. Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. **Planta**, v. 215, n. 2, p. 239-247, 2002.
- LOGAN, C. Bacterial boll rot of cotton (*Xanthomonas malvacearum* (ef smith) dowson) i. A comparison of two inoculation techniques for the assessment of host resistance. **Annals of Applied Biology**, v. 46, n. 2, p. 230-242, 1958.
- MAJI, A. T. I. T.; NATH, RANJAN. Pathogenicity test by using different inoculation methods on *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* caused of black rot of cabbage. **IMPACT International Journal of research in Applied Natural and Social Sciences**, v. 3, n. 2, p. 53-58, 2015.

- MANJAYA, J. G.; PAWAR, S. E. New genes for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and their inheritance. **Euphytica**, v. 106, p. 205-208, 1999.
- MARIN, A. A. L.; CERVIGNI, G.; ALVES, M. M.; BARROS, E. G. Marker assisted selection in the development of disease resistant plants, with emphasis on common bean and soybean. **Fitopatologia Brasileira**, 2005.
- MARINGONI, A. C.; LAURETTI, R. L. B. Reação de genótipos de feijoeiro comum a *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *Macrophomina phaseolina* e *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 34, n. 4, p. 535-542, 1999.
- MELCHING, J. S.; DOWLER, W. M.; KOOGLE, D. L.; ROYER, M. H. Effect of plant and leaf age on susceptibility of soybean to soybean rust. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 10, n. 1, p. 30-35, 1988.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de soja *Glycine max* (L.) Merrill). Anexo II, 2007. Disponível em <<https://www.gov.br/agricultura>> Acesso em: 12/10/2019.
- NAKATANI, A. K.; LOPES, R.; CAMARGO, L. EA. Variabilidade genética de *Xanthomonas citri* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 2, p. 116-120, 2009.
- NCBI – NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 14 de Junho de 2019.
- NEVES, D. A.; GUIMARÃES, L.; FERRAZ, H. G.; ALFENAS, A. C. Favorable conditions for *Xanthomonas citri* infection in Eucalyptus spp. **Tropical Plant Pathology**, v. 39, n. 6, p. 428-433, 2014.
- NOCITI, L. A.; CAMARGO, M.; RODRIGUES NETO, J.; FRANCISCHINI, F. J.; BELASQUE JÚNIOR, J. Agressividade de linhagens de *Xanthomonas citri* pv. *aurantifolii* tipo C em lima ácida 'Galego'. **Fitopatologia Brasileira**, p. 140-146, 2006.
- OCHOLA, D.; OCIMATI, W.; TINZAARA, W.; BLOMME, G.; KARAMURA, E. Interactive effects of fertilizer and inoculum concentration on subsequent development of *Xanthomonas* wilt in banana. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 35, p. 2727-2735, 2014.
- PARK, H. J.; HAN, S. W.; OH, C.; LEE, S.; RA, D.; LEE, S. H.; HEU, S. Avirulence gene diversity of *Xanthomonas citri* pv. *glycines* isolated in Korea. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 9, p. 1500-1509, 2008.
- PASTOR-CORRALES, M. A.; BEEBE, S. E.; CORREA, F. J. Comparing two inoculation techniques for evaluating resistance in beans to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Internacional Conference on Plant Pathogenic Bacteria**, p. 493-503, 1981.
- PEŇÁZOVÁ, E.; KOPTA, T.; JURICA, M.; PEČENKA, J.; EICHMEIER, A.; POKLUDA, R. Testing of inoculation methods and susceptibility testing of perspective cabbage breeding lines (*Brassica oleracea* convar. *capitata*) to the black rot disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Acta Universitatis**

**Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**, v. 66, n. 1, p. 139-148, 2018.

PRATHUANGWONG, S.; AMNUAKIT, K. Studies on tolerance and Rate-reducing Bacterial Pustule of Soybean Cultivars/Lines. **Natural Science**, Department of Plant Pathology. v. 21, n. 4, p.408-426, 1987.

PRATHUANGWONG, S.; KHANDEJ, K. Development of the New Methods for Ecological Study of Soybean Bacterial Pustule: An Artificial Inoculation Method of Soybean Seed with *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* for Inducing Disease Expression. **Agriculture and Natural Resources**, v. 32, n. 1, p. 84-89, 1998.

REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 34 p., 2006.

ROBESON, D. J.; BRETSCHEIDER, KARIN E.; GONELLA, M. P. A hydathode inoculation technique for the simulation of natural black rot infection of cabbage by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Annals of Applied Biology**, v. 115, n. 3, p. 455-459, 1989.

RODRIGUES NETO, J. Coleção de Culturas IBSBF. Laboratório de Bacteriologia Vegetal do Instituto Biológico de São Paulo. Disponível em <[http://biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/files/pdf/catalogo\\_IBSBF.pdf](http://biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/files/pdf/catalogo_IBSBF.pdf)> Acesso em: 05/01/2021.

ROMEIRO, R. S. Inoculação de bactérias fitopatogênicas em plantas. In: Romeiro, R.S. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, cap.8, p.65-80, 2001.

SAIN, S. K. Efficacy of plant growth promoting rhizobacteria in in vitro inhibition of *Xanthomonas citri* pv. *glycines* and prevention of bacterial pustules of soybean in the field. **Journal of Biological Control**, v. 24, n. 4, p. 333-337, 2010.

SAIN, S. K.; GOUR, H. N. Pathological and physio-biochemical characterization of *Xanthomonas citri* pv. *glycines*, incitant of *Glycine max* leaf pustules. **Indian Phytopathologic**, v. 66, n.1, pp. 20-27. 2013.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SEAB DERAL – Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (Departamento de Economia Rural). Soja: Análise da Conjuntura Agropecuária. Outubro de 2012. Disponível em<[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja\\_2012\\_13.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja_2012_13.pdf)> Acesso em: 02 de Junho de 2019.

SEDIYAMA, T.; SILVA, F.; BORÉM, A. **Soja: Do Plantio à Colheita**. Viçosa: UFV, 333p. 2015.

SEGADO, P.; DOMÍNGUEZ, E.; HEREDIA, A. Ultrastructure of the epidermal cell wall and cuticle of tomato fruit (*Solanum lycopersicum* L.) during development. **Plant Physiology**, v. 170, n. 2, p. 935-946, 2016.

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

SHARABANI, G.; SHTIENBERG, D.; BORENSTEIN, M.; SHULHANI, R.;

LOFTHOUSE, M.; SOFER, M.; MANULIS-SASSON, S. Effects of plant age on

disease development and virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. **Plant Pathology**, v. 62, n. 5, p. 1114-1122, 2013.

SHARMA, A.; NAIR, P. M.; PAWAR, S. E. Identification of soybean strains resistant to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. **Euphytica**, v. 67, n. 1-2, p.95-99, 1993.

SHARMA, J.; SHARMA, K. K.; KUMAR, A.; MONDAL, K. K.; THALOR, S.; MAITY, A.; JADHAV, V. T. Pomegranate bacterial blight: symptomatology and rapid inoculation technique for *Xanthomonas citri* pv. *punicae*. **Journal of plant pathology**, v. 99, n. 1, p. 109-119, 2017.

SILVA, A. G. Histopatologia e influência de nutrientes na intensidade da bacteriose foliar do Eucalipto causada por *Xanthomonas citri*. 71 p. 2007. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Fitopatologia)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SILVA, A.; SANTOS, I.; BALBINOT, A.L.; MATEI, G.; OLIVEIRA, P.H. Reação de genótipos de feijão ao crestamento bacteriano comum, avaliado por dois métodos de inoculação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.2019-2024, 2009.

SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 171-175, 2003.

SILVEIRA, E.B.; MARIANO, R. L. R.; MICHEREFF, S. J. OLIVEIRA, S.M.A. Influência da temperatura, umidade, concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* e idade do fruto no desenvolvimento da mancha-aquosa em melão. **Fitopatologia Brasileira**, 29:034-038, 2004.

SIVIERO, A.; FURTADO, E.L.; BOAVA, L.P.; BARBASSO, D.V.; MACHADO, M.A. Avaliação de métodos de inoculação de *Phytophthora parasitica* em plântulas e plantas jovens de citros. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.6, p. 574-580. 2002.

SOARES, R. M.; ARIAS, C. A. A. Seleção de linhagens de soja da Embrapa para resistência a doenças: histórico de 2008 a 2014. 21. ed. Londrina - Pr: **Documentos/Embrapa Soja**, 42 p. 2016.

SUTTON, J. C. Predictive value of weather variables in the epidemiology and management of foliar diseases. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, DF, v. 13, p. 305-312, 1988.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence

alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TORRES, J. P. *Xanthomonas citri* pv. *phaseoli* em Feijoeiro: Sobrevivência em restos de cultura e ocorrência em sementes produzidas no estado do Paraná. 2001. 98 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia, Universidade Estadual Paulista Faculdade de Ciências Agronômicas Campus de Botucatu, Botucatu, 2001.

USDA. The Plants Database. National Plant Data Center, Baton Rouge, 2019. Disponível em <<http://plants.usda.gov>> Acesso em 02 de Junho de 2019.

VAN, K.; KIM, D.H.; CAI, C.M.; KIM, M.Y.; SHIN, J.H.; GRAHAM, M.A.; SHOEMAKER, R.C.; CHOI, B.S.; YANG, T.J.; LEE, S.H. Sequence level analysis of recently duplicated regions in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] genome. **DNA Research**, 15 (2), pp. 93-102. 2008.

VERNETTI, F. J.; VERNETTI JUNIOR, F.J. Genética da soja: caracteres qualitativos e diversidade genética. Brasília, DF: **Embrapa Informação Tecnológica**. 221p, 2009.

VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas citri* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, n. 3, p. 268-270, 2016.

WEINDLING, R. Bacterial blight of cotton under conditions of artificial inoculation. **Technical Bulletin of the U. S. Department of Agriculture**. no. 956. (No. 1488-2016-124077). 1948.

WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A., LANE, D. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WRATHER, J. ALLEN; KOENNING, STEVE R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States 2003 to 2005. **Journal of nematology**, v. 38, n. 2, p. 173, 2006.

YOUNG, H. M.; MAROIS, J. J.; WRIGHT, D. L., NARVÁEZ, D. F.; O'BRIEN, G. K. Epidemiology of soybean rust in soybean sentinel plots in Florida. **Plant disease**, v. 95, n. 6, p. 744-750, 2011.

ZADOKS, J.C.; SCHEIN, R.D. Epidemiology and plant disease management. New York: **Oxford University Press**, 427p, 1979.

ZINSOU, V. A.; AFOUDA, L. A. C.; ZOUMAROU-WALLIS, N.; PATE-BATA, T.; DOSSOU, L.; GÖTZ, M.; WINTER, S. Occurrence and Characterisation of *Xanthomonas citri* pv. *glycines*, Causing Bacterial Pustules on Soybean in Guinea Savanna of Benin. **African Crop Science Journal**, v. 23, n. 3, p. 203-210, 2015.

ZIV, C.; ZHAO, Z.; GAO, Y. G.; XIA, Y. Multifunctional roles of plant cuticle during plant-pathogen interactions. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1088, 2018.