



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA
CURSO DE DOUTORADO EM AGROECOLOGIA**

**MANEJO DE DOENÇAS EM VARIEDADES TRADICIONAIS E CULTIVARES
BIOFORTIFICADAS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L) Walp]**

LARISSE RAQUEL CARVALHO DIAS

São Luís - MA

2023

LARISSE RAQUEL CARVALHO DIAS
Bióloga

**MANEJO DE DOENÇAS EM VARIEDADES TRADICIONAIS E CULTIVARES
BIOFORTIFICADAS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L) Walp]**

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências à obtenção do grau de Doutora em Agroecologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Antônia Alice Costa Rodrigues.

São Luís - MA

2023

Dias, Larisse Raquel Carvalho.

Manejo de doenças em variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] / Larisse Raquel Carvalho Dias. – São Luís, 2023.

131 f

Tese (Doutorado em Agroecologia) – Universidade Estadual do Maranhão, 2023.

Orientadora: Profa. Dra. Antônia Alice Costa Rodrigues.

1. Biocontrole. 2. Doenças fúngicas. 3. *Vigna unguiculata*. 4. Qualidade. I. Título.

CDU: 633.33-29

Elaborado por Giselle Frazão Tavares- CRB 13/665

LARISSA RAQUEL CARVALHO DIAS

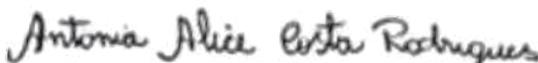
MANEJO DE DOENÇAS EM VARIEDADES TRADICIONAIS E CULTIVARES
BIOFORTIFICADAS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências à obtenção do grau de Doutora em Agroecologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Antônia Alice Costa Rodrigues.

Aprovada em: 15/ 02/ 2023

Comissão julgadora:



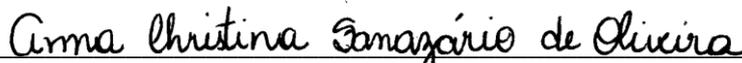
Prof.^a Dr.^a Antônia Alice Costa Rodrigues.
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA



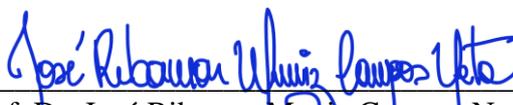
Prof.^a Dr.^a Thais Roseli Corrêa
Universidade Estadual do Maranhão – UEMA



Prof.^a Dr.^a Erlen Keila Candido e Silva
Universidade Estadual do Maranhão - UEMA



Prof.^a Dr.^a Anna Christina Sanazário de Oliveira
Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF



Prof. Dr. José Ribamar Muniz Campos Neto
Instituto Federal do Maranhão – IFMA

Ao meu amado avohai (avô e pai),

José Ribamar de Sousa Freitas (*in memorian*)

que mesmo não entendendo o porquê da minha ausência ao seu lado, sempre me recebia com todo carinho e apoio do mundo, durante os feriados prolongados. Meu avohai, o maior amor da minha vida, aquele que mesmo sendo avô foi meu modelo de pai, e que modelo!! Pai, tua filha saiu de casa para fazer o mestrado e agora está defendendo o Doutorado!! Nossa, queria muito que você estivesse vivo para comemorarmos. Eu sei exatamente quais seriam os seus comentários: minha filha e quanto tu ganha? A Minha filha é Doutora “*cumpade*”; Ei Chica, minha filha é Doutora. Você ia falar pra todo mundo aonde fosse! Quanto orgulho você tinha de mim, e eu de você! Essa distância toda valeu a pena meu velho, você e minha família foram minha maior inspiração! Tudo por vocês!

Eliane de Fatima Sousa (*in memorian*),

Uma representação de mãe pra mim, aquela que era sinônimo de acolhimento, de cuidado, de companheirismo, de amizade e de amor! Como sinto sua falta!! Nunca pensei que fosse te perder tão cedo. Assim como com meu pai, eu não pude me desperdir de você. E assim como com meu pai, foi a maneira que eu encontrei para te preservar, para continuar aqui no meu mundinho distante achando que tudo estar como antes. Mas no fundo eu sei que não tenho mais presencialmente, tudo que tínhamos quando nos encontrávamos, mas preservarei toda nossa história pra sempre comigo.

A minha mãe,

Cléa Maria Carvalho Pereira

Aos meus irmãos,

Larisson Antônio Carvalho Pereira e Alisson Francisco Carvalho Pereira

Por todo amor, compreensão e chamadas de vídeos, que me revigoraram, devo a minha fortaleza a vocês.

Lorena Rejane Monteiro Farias,

Por todo amor, companheirismo, por ser família fora de casa, por todo apoio prático e sentimental durante a construção desse curso que sempre me revigoraram, devo boa parte da minha pesquisa a você.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, por ter me levantado sempre, mesmo quando eu achei que não tinha mais forças. Por ter me dado o dom da vida e ter implantado em mim a vontade de lutar por ela.

À **Professora Dra. Antônia Alice** que me recebeu de braços abertos e sempre me deu o seu melhor. Está perto e poder ver o tamanho da força e zelo que cabe dentro dessa grande mulher é um privilégio. São tantos compromissos, tantos orientados e pasmem, nenhum fica sem acolhimento. A quem olho e encontro inspiração para seguir. Lhe tenho uma imensa admiração Profa!!

Ao **Dr. Candido Athayde Sobrinho**, o meu eterno orientador. A quem eu devo todo o início da minha trajetória e quem me apresentou a Fitopatologia, me repassou todos os ensinamentos da maneira mais cuidadosa e detalhada, que se preocupou com todo o meu trilhar. A quem considero como o meu pai científico.

À **Professora Dra. Erlen Keila Candido e Silva** pelo apoio, confiança e conselhos gentis.

Ruan Íthalo Ferreira Cavalcante por sempre se dispor a me ajudar mesmo nos fins de semana, desde o meu mestrado.

Eliza Gonçalves e Erica Louzeiro por serem braço forte e companhia leve nessa jornada.

Leonardo De Jesus Machado Gois por toda a calma e disponibilidade que foram fundamentais para mim.

Ítalo (IFMA) por todas as tardes que veio de bem longe para nos apoiar no laboratório.

Ao povoado **Angelim**, situado em Balsas – MA, em especial a dona **Carmelita, Seu João, Davi e Joãozinho**, pela ajuda e pelo acolhimento durante a avaliação do experimento de campo.

Wantony e Leandra por todo apoio na parte de campo.

Luís Hernadez por toda amizade e pela contribuição intelectual, em especial nas análises estatísticas.

À minha grande amiga **Geysa Mesquita** e meus sobrinhos **Ruy Filho e Ryan Gabriel**, que mesmo distante, emanavam sinceros votos positivos e preocupação com o meu bem-estar, e por serem sempre fonte de amor e felicidade para mim.

Aos meu amigo **Erasmão Ribeiro** (Fitopatologia/EMBRAPA) que sempre me confortou em dias difíceis e sempre mantinham a prontidão nos seus “socorros”.

À **Fundação Cargill**, pelo financiamento da nossa proposta de pesquisa através da aprovação do projeto;

À **Anna**, pelo apoio no projeto da Fundação Cargill.

À Micoteca Prof. Gilson Soares da Silva – **MGSS**, por ceder os isolados de microrganismos.

À Universidade Estadual do Maranhão – UEMA.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia e professores;

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação em **Rayanne, Neto e Nilson.**

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos que, sem a qual, seria inviável concluir esta etapa.

E para todos aqueles que emanaram boas vibrações e foram como luz de reforço nessa estrada.

OBRIGADA!!!

Lembre-se de olhar para as estrelas e não para baixo, para seus pés. Nunca desista do trabalho. Trabalho dá significado e propósito, a vida fica vazia sem eles. E se você tiver sorte o suficiente para encontrar o amor, não o deixe ir embora.

Stephen Hawking

*Dê o seu melhor em tudo que escolher fazer
(Frases motivacionais usadas durante essa trajetória)*

venit, vixit et vicit

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	20
REFERÊNCIAS	29
CAPÍTULO II - Estudo comparativo da fisiologia e sanidade de sementes tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi	35
RESUMO	36
INTRODUÇÃO.....	37
METODOLOGIA.....	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47
CAPÍTULO III - Biocontrole de <i>Bacillus methylotrophicus</i> em <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tracheiphilum</i> <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> e reação de resistência de plantas de feijão-caupi biofortificadas e tradicionais, coinoculadas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp.	50
RESUMO	51
INTRODUÇÃO.....	52
MATERIAL E MÉTODOS.....	53
RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5 CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS	71
CAPÍTULO IV - <i>Bacillus methylotrophicus</i> como biocontrole para <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc e <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid. em variedades biofortificadas e tradicionais de feijão-caupi acrescidas ou não com <i>Bradyrhizobium</i> sp.	75
RESUMO	76
INTRODUÇÃO.....	77
MATERIAL E MÉTODOS.....	78
RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS	103
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	106
ANEXO 1: Normas das revistas.....	108

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO III

- Figura 3:** Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) na altura das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....61
- Figura 4:** Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) no número de folhas das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....63
- Figura 5:** Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) no comprimento da raiz das cultivares tradicionais e biofortificadas.....64
- Figura 6:** Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) no número de nódulos de cultivares tradicionais e biofortificadas.....65
- Figura 7:** Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) na massa fresca da parte aérea de cultivares tradicionais e biofortificadas.....66
- Figura 8:** Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) na massa seca da parte aérea de cultivares tradicionais e biofortificadas.....67

CAPÍTULO IV

Figura 1: Efeito antagonístico de *B. methylotrophicus* (MGS 276) contra *S. rolfssii* e *M. phaseolina* em meio de cultura BDA, Testemunha *S. rolfssii* e *M. phaseolina* (A e C) respectivamente; Avaliação do antagonismo in vitro sobre *S. rolfssii* e *M. phaseolina*, pelo método do pareamento em círculo (B) e (D) respectivamente.....78

Figura 2: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PBFBN) na altura das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....85

Figura 3: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PBFBN) na massa fresca e seca da parte aérea das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....88

Figura 4: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PBFBN) na massa fresca e seca da raiz das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....90

Figura 5: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PBFBN) no número de folhas das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....91

Figura 6: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfssii* (PBFBN) no número de nódulos das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....92

Figura 7: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina*

phaseolina (PBFBN) na altura das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....93

Figura 8: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) na massa fresca e seca da parte aérea das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....95

Figura 9: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) na massa fresca e seca da raiz das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....97

Figura 10: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) no número de folhas das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....98

Figura 11: Promoção do crescimento de variedades de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) no número de nódulos das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.....99

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1: Valores médios do Teor de água (T.A); Germinação (G); Índice de velocidade de germinação (IVG); Comprimento de radícula (CR) e Comprimento de parte aérea (CPA) das variedades tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi 41
- Tabela 2: Valores médios do Vigor; Emergência (E); Índice de velocidade de emergência (IVE) e condutividade elétrica (CE) das variedades tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi 43
- Tabela 3: Incidência de fungos (%) identificados em variedades tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi 44

CAPÍTULO III

- Tabela 1 Reação de variedades de feijão-caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sem e com microbiolização de *Bradyrhizobium* sp. Incidência da doença (INC); Médias de notas (Médias); Índice de severidade da doença (SVD). 61
- Tabela 2 Variedades de feijão-caupi microbiolizadas com *Bacillus methylotrophicus* e inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, acrescidas ou não de *Bradyrhizobium* sp. 59

CAPÍTULO IV

- Tabela 1 Percentagem de inibição do crescimento micelial (cm) do fungo *S. rolfsii* e *M. phaseolina* após sete dias de avaliação. 847
- Tabela 2 Variedades de feijão-caupi microbiolizadas com *B. methylotrophicus* e inoculadas com *S. rolfsii*, acrescidas ou não de *Bradyrhizobium* sp. Incidência (INC). 849

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1	107
---------------	-----

MANEJO DE DOENÇAS EM VARIEDADES TRADICIONAIS E CULTIVARES BIOFORTIFICADAS DE FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Autor: Larisse Raquel Carvalho Dias

Orientadora: Antônia Alice Costa Rodrigues

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), possui alto valor nutricional, representa um componente básico da dieta nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, além de fazer parte de programas de biofortificação alimentar, como uma alternativa de qualidade alimentar e nutricional às populações carentes. Esta cultura, apesar de rústica, é acometida por várias doenças, dentre as quais se destacam as doenças fúngicas. Por isso, este trabalho objetivou avaliar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes de variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi e a ação de *B. methylotrophicus* nessas variedades contra as principais doenças que afetam a cultura, enriquecidas com *Bradyrhizobium*, como métodos de controle de doenças e promoção de crescimento. Foram realizados testes *in vitro* para verificar o antagonismo de *B. methylotrophicus* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* e avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes tradicionais coletadas de pequenos agricultores das comunidades rurais e de sementes biofortificadas obtidas através da EMBRAPA, tais sementes foram testadas em casa de vegetação, quanto à reação a Murcha de *Fusarium*, podridão-cinzenta do caule e a murcha de esclerócio acrescidas ou não com *Bradyrhizobium* sp. Foram avaliados ainda parâmetros de crescimento e biocontrole promovido por *B. methylotrophicus*. Nos testes *in vitro*, *B. methylotrophicus* demonstrou efeito antagonista sobre *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *S. rolfsii* e *M. phaseolina*. Todas as variedades tradicionais e biofortificadas apresentaram alto valor de germinação e emergência em casa de vegetação. O índice de velocidade de germinação e emergência indicaram as cultivares BRS Aracê e BRS Xique-Xique as mais vigorosas. Nos testes de sanidade a maior incidência foram dos fungos de armazenamento *Aspergillus* sp. e o *Penicillium* sp., com maior incidência na variedade BRS Tumucumaque, provavelmente está relacionado ao maior teor de água presente nessa variedade. Sementes microbiolizadas com *Bradyrhizobium* sp. apresentaram aumento da altura das plantas, número de folhas, comprimento da raiz e número de nódulos para as variedades Angelim e Tumucumaque. O percentual de controle quanto a reação à Murcha de *Fusarium* foi mais eficiente nas plantas quando coinoculadas com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. apenas para a variedade Angelim e Aracê. As variedades Manteguinha, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique responderam melhor ao tratamento apenas com *B. methylotrophicus*. A coinoculação com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. e essas bactérias microbiolizadas isoladamente apresentaram efeito biocontrolador sobre podridão-cinzenta do caule e murcha de esclerócio, em casa de vegetação. Nossos resultados indicam o potencial do uso de *B. methylotrophicus* como biocontrole e *Bradyrhizobium* sp. como promotor de crescimento, ambos configuram uma alternativa viável e sustentável para o manejo da Murcha de *Fusarium*, Murcha de esclerócio e da podridão-cinzenta nos sistemas produtivos de feijão-caupi.

Palavras-chaves: Biocontrole, Doenças fúngicas, Promoção do crescimento, Qualidade alimentar.

MANAGEMENT OF DISEASES IN TRADITIONAL VARIETIES AND BIOFORTIFIED CULTIVARS OF COWPEA [*Vigna unguiculata* (L) Walp]

Autor: Larisse Raquel Carvalho Dias

Orientadora: Antônia Alice Costa Rodrigues

ABSTRACT

The cowpea (*Vigna unguiculata*), has high nutritional value, and represents a basic component of the diet in the North and Northeast regions of Brazil, in addition to being part of food biofortification programs, as an alternative of food and nutritional quality for the needy populations. This culture, although rustic, is affected by several diseases, among which fungal diseases stand out. Therefore, this work aimed to develop biocontrol for the management of diseases in traditional and biofortified cultivars of cowpea. In vitro tests were performed to verify the antagonism of *Bacillus methylotrophicus* against *Fusarium oxysporum* f. sp *tracheiphilum*, *Sclerotium rolfsii*, and *Macrophomina phaseolina* and evaluation of the physiological and sanitary quality of traditional seeds collected from small farmers in rural communities and biofortified seeds obtained through EMBRAPA, such seeds were tested in a greenhouse, regarding the reaction to fusariosis, rot -ash stem and sclerotia wilt added or not with *Bradyrhizobium* sp. growth parameters and biocontrol promoted by *B. methylotrophicus* were also evaluated. In *in vitro* tests, *B. methylotrophicus* showed an antagonistic effect on *F. oxysporum* f. sp *tracheiphilum*, *S. rolfsii*, and *M. phaseolina*. All traditional and biofortified varieties showed high germination and emergence value in the greenhouse. The germination and emergence speed index indicated that BRS Aracê and BRS Xique-Xique were the most vigorous cultivars. In insanity tests, the highest incidence was of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp., with a higher incidence in the BRS Tumucumaque variety, which is probably related to the higher water content present in this variety. Microbiolized seeds with *Bradyrhizobium* sp. showed an increase in plant height, number of leaves, root length, and number of nodules for Angelim and Tumucumaque varieties. The percentage of control in terms of reaction to fusariosis was more efficient in plants when co-inoculated with *B. methylotrophicus* and *Bradyrhizobium* sp. only for the variety Angelim and Aracê. The Manteguinha, BRS Tumucumaque, and BRS Xique-Xique varieties responded better to treatment with only *B. methylotrophicus*. Coinoculation with *B. methylotrophicus* and *Bradyrhizobium* sp. and these isolated microbiolized bacteria showed a biocontrol effect on stem gray rot and sclerotia wilt in a greenhouse. Our results indicate the potential of using *B. methylotrophicus* as a biocontrol and *Bradyrhizobium* sp. as a growth promoter, both constitute a viable and sustainable alternative for the management of fusariosis, sclerotia wilt and gray rot in cowpea production systems.

Keywords: Biocontrol, Fungal diseases, growth promotion, Food quality.

CAPÍTULO I



CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO

1 INTRODUÇÃO GERAL

A insegurança alimentar pela carência de alimentos é uma problemática enfrentada em diversos países. Além disso, algumas populações possuem uma dieta pouco diversa e com alimentos de baixa quantidade nutricional. Isso resgata a preocupação com o processo produtivo em sua origem, qualidade e efeito sobre os consumidores, indicando a necessidade de medidas que garantam a segurança e eficiência alimentar (CALDAS *et al.*, 2012).

No Brasil, os impactos na economia causados pela pandemia agravaram ainda mais a insegurança alimentar principalmente devido aos elevados custos que limitam a acessibilidade aos alimentos para muitas famílias (DA SILVA PINHEIRO *et al.*, 2022). Os maiores índices de insegurança alimentar e nutricional encontram-se nas regiões Norte e Nordeste expressos em 38,1% e 36,1%, respectivamente. No Nordeste, se destaca os estados do Maranhão (64,6%) e Piauí (58,6%), devido as piores condições de renda e trabalho encontradas nessas localidades (BEZERRA *et al.*, 2020).

Um dos principais componentes da alimentação dessas regiões é o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp]. Seu cultivo é crescente no Brasil, e a maior parte da produção está concentrada na região Nordeste, essa cultura é popularmente disseminada na região Meio-Norte, agregando significativa importância socioeconômica, principalmente para agricultores familiares, devido a sua rusticidade (ALMEIDA *et al.*, 2021). Os grãos do feijão-caupi possuem indispensável valor nutricional devido a sua riqueza em proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

A produção de feijão-caupi, é estimada no Brasil, em cerca de 630,8 mil t, e a safra de 2021/22 representou o valor recorde de 222 mil toneladas destinada a exportação. O Norte e Nordeste são os principais responsáveis pela produtividade nacional, a previsão para a primeira safra de 2022/23, gira em torno de 371,3 mil toneladas. No estado do Maranhão, essa cultura tem importância para a cadeia produtiva devido sua alta demanda consumidora (CONAB, 2022). Devido a esse nível de notoriedade e importância do feijão-caupi para o país, a cultura está entre as culturas selecionadas para o processo de biofortificação.

A biofortificação vegetal é o desenvolvimento de cultivares com maiores teores de minerais e vitaminas, vale ressaltar que esse processo de melhoramento é o convencional, e não possui qualquer relação com a transgenia, na qual inclui genes de outras espécies que podem até mesmo não se limitar a espécies botânicas (NUTTI *et al.*, 2010).

Investir no processo de biofortificação faz parte dos planos políticos públicos que visam suprir a segurança alimentar, nutricional e de sustentabilidade socioeconômica para combater a

desnutrição alimentar aumentando a eficiência alimentar. O uso de alimentos mais acessíveis para essa melhoria, é a oportunidade para os produtores terem acesso a uma alimentação rica em nutrientes. Dessa forma, alimentos básicos que possam conter o suplemento mineral necessário, diminuindo as deficiências nutricionais é uma excelente forma de promover a segurança alimentar e alcançar as populações mais carentes. Além disso, cultivares com melhores características agrônômicas, conseqüentemente geram maiores rendimentos, resistência a pragas e tolerância a estresse (NUTTI *et al.*, 2010).

As cultivares de feijão-caupi obtidas via melhoramento convencional: BRS Xique-Xique, BRS Aracê e BRS Tumucumaque, possuem maiores teores de ferro, zinco e proteína, que são características desejáveis para o processo de biofortificação nutricional da cultura (ROCHA *et al.*, 2014).

No entanto, as cultivares com potenciais para a biofortificação estão geralmente relacionadas com um baixo potencial produtivo, o que pode implicar na preferência por cultivares com maior produtividade somada a posterior enriquecimento com o nutriente de interesse seja realizado via solo ou aplicação foliar, assim resultando no aumento desse nutriente nos grãos. Portanto, é fundamental que o melhoramento genético das cultivares biofortificadas aumentem a sua capacidade produtiva (ALVES, 2017).

Além disso, a cultura também pode ser acometida por vários fitopatógenos, cuja ação patogênica resultam em perdas em qualidade e volume de produção (EMBRAPA, 2011). Por isso, a qualidade sanitária também é uma ameaça para a produção desses alimentos, que deve ser considerada e mantida para garantir a eficiência da produção dos alimentos biofortificados (CALDAS *et al.*, 2012). Segundo Athayde Sobrinho (2017), dentre as principais doenças da cultura destacam-se as causadas por fungos, bactérias, vírus e nematóides.

As doenças de origem fúngicas são as que mais afetam a cultura, essa ocorrência persiste desde o cultivo em campo até o armazenamento. Afetam ainda, os mais diversos órgãos vegetais existentes, dentre os quais podemos citar: as podridões que atacam o caule da planta como a podridão-cinzenta do caule [*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid], a murcha de esclerócio (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) e a murcha causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp *tracheiphilum* (Smith) Snyder & Hansen que acomete o sistema vascular, e também as foliares como a cercosporiose, o oídio e a ferrugem (ATHAYDE SOBRINHO, 2016).

Para o cultivo do feijão-caupi, faz-se uso do controle químico no manejo de pragas e doenças, para evitar perdas da produção (PIMENTEL *et al.*, 2010; FONSECA *et al.*, 2015). Contudo, para o controle dos fitopatógenos devemos considerar a inexistência de agroquímicos

registrados no Ministério da Agricultura e Abastecimento para o controle das doenças que acomete a espécie do feijão-caupi (AGROFIT, 2022), o que reforça ainda mais a necessidade de manejos agroecológicos de doenças, que busque por meio de métodos alternativos para garantir a eficiência no combate dessas doenças, sem colocar em risco a saúde do produtor, do consumidor e do ambiente (MARSARO JÚNIOR; VILARINHO, 2011; BIGATON *et al.*, 2013; SILVA; ATHAYDE SOBRINHO, 2017; BRASIL, 2017).

O biocontrole está entre as medidas ecologicamente sustentáveis, quando comparada ao uso do controle químico, isto devido a capacidade que diversos microrganismos existentes na natureza têm apresentado para controle de fitopatógenos de modo eficiente, principalmente fungos e bactérias antagonistas (VAZ *et al.*, 2011).

O uso de cultivares resistentes está entre uma das medidas mais eficientes para o controle em diversos fitopatógenos, podendo até mesmo ser a única opção viável de controle em alguns patossistemas. Mas para tanto, é necessário conhecer bem quais são as cultivares mais resistentes (RODRIGUES *et al.*, 2006).

Com o objetivo de melhorar o desempenho das leguminosas, o uso de rizobactérias como as do gênero *Bacillus* sp., vêm sendo desenvolvido por meio de várias pesquisas através da inoculação de forma isolada ou com a coinoculação com outros microrganismos, tendo comprovada eficiência no processo de indução de resistência a doenças (ZAHORA *et al.*, 2016), e trazendo vários benefícios para desenvolvimento vegetal, como por exemplo na promoção de crescimento (ESPÍNDOLA, 2017).

Frequentemente, o uso de *Bacillus* é associado às bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) como as do gênero *Bradyrhizobium* sp., estes microrganismos também são capazes de estimular diversos processos fisiológicos que favorecem o funcionamento do organismo vegetal. Dentre eles, o gênero *Bradyrhizobium* sp. possui reconhecida capacidade biológica de fixação de nitrogênio (HUNGRIA, 2011).

Essas alternativas, auxiliam o manejo agroecológico dos sistemas produtivos, diante do exposto, este trabalho objetiva avaliar a qualidade fisiológica e sanitária das sementes de variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi e a ação de *B. methylotrophicus* e reação de variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi à Murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*), murcha de esclerócio (*Sclerotium rolfsii*) e à podridão-cinzenta (*Macrophomina phaseolina*), enriquecidas com *Bradyrhizobium*, como métodos de controle de doenças e promoção de crescimento.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Biofortificação alimentar e fome oculta

A insegurança alimentar e nutricional é uma problemática constante. Isso exige reflexões acerca da capacidade de produção de alimentos futuros. Alguns alimentos produzidos não possuem a quantidade de nutrientes necessários para manter a eficiência na alimentação humana (BEZERRA *et al.*, 2020). Essa deficiência nutricional dos alimentos conhecida como fome oculta é uma forma de desnutrição que afeta quase um terço da população mundial e caracteriza-se pela ingestão insuficiente de vitaminas e sais minerais, que ocorre devido a uma dieta pobre em nutriente ou a falta de acesso a alimentos nutritivos, o que se torna um grande desafio global de saúde pública (UNICEF, 2020).

A fome oculta ameaça a saúde, incluindo anemia, comprometimento do sistema imunológico, retardo no crescimento e desenvolvimento cognitivo em crianças. Dessa forma, para combater a fome oculta é necessário fortalecer a segurança alimentar e nutricional, através do processo da biofortificação dos alimentos (GRISA, 2012). Esse processo visa enriquecer a quantidade de nutrientes essenciais presente nos alimentos (THAVARAJAH *et al.*, 2010).

Além disso, investir em agricultura sustentável e na produção de alimentos nutritivos pode contribuir significativamente para reduzir a fome oculta em comunidades rurais e urbanas. O fortalecimento da agricultura familiar pode aumentar a produção de alimentos nutritivos, melhorar a segurança alimentar e nutricional reduzindo a fome oculta em áreas rurais (KISAKYE *et al.*, 2022).

Dentre as espécies alvos da biofortificação, está o feijão-caupi. Vários trabalhos tem sido desenvolvidos para identificar o potencial de cultivares de feijão-caupi em prol do enriquecimento alimentar, através da avaliação do conteúdo de ferro, zinco e proteínas em feijões do tipo verde; fradinho e outras diversas variedades de feijão-caupi (BARRETO *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2011); incluindo a seleção de germoplasma elite para multiplicação e avaliação de linhagens ricas em ferro e zinco (SANTOS *et al.*, 2009); além de cruzamentos dialélicos de genótipos de feijão-caupi biofortificados e seleção dos melhores genitores capazes de gerar populações com altos teores de ferro, zinco, e proteína (CARVALHO *et al.*, 2011).

Apesar da existência de variedades já desenvolvidas de feijão-caupi, podem existir cultivares tradicionais com esse potencial, essas descobertas devem ser validadas por meio de pesquisas (DA SILVA *et al.*, 2019). Além de identificar esse potencial, o próximo desafio é conhecer e comparar os aspectos fisiológicos e sanitários de cultivares tradicionais e

biofortificadas, o que não foi evidenciado pelos estudos supracitados. Pesquisas que evidenciem e comparem esses aspectos, para traçar o perfil mais adequado entre essas cultivares, é uma lacuna que deve ser preenchida por meio de pesquisas que exponham essas diferenças, caracterizando melhor todos os aspectos envolvidos no sistema de produção, para garantir os maiores rendimentos para as cultivares com maior potencial de eficiência alimentar (THAVARAJAH *et al.*, 2010).

Com isso, a introdução de cultivares biofortificadas em comunidades carentes, bem como o conhecimento da qualidade sanitária e fisiológica dessas sementes, a delimitação do potencial sanitário e fisiológico das variedades tradicionais, são aspectos fundamentais para ampliar o programa de biofortificação do feijão-caupi.

1.2.2 A cultura do feijão-caupi

O feijão-caupi pertence à família Fabaceae, é uma dicotiledônia originária da África. Suas flores variam entre branco, tons de rosa e lilás, os frutos são botanicamente reconhecidos através do formato de legume (PEREZ, 2019). Essa cultura é fonte de alimento importante e estratégico em regiões tropicais e subtropicais do mundo, encontra-se em expansão nacional e é amplamente cultivado na região Meio -Norte (FILGUEIRAS *et al.*, 2009; FREIRE FILHO *et al.*, 2011). Seus grãos apresentam alto valor nutricional, por serem ricos em proteínas, aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras. Os tipos de grãos preferenciais para cultivo são os que apresentam cor marrom, sempre-verdes e branco, dentre os quais o branco e sempre-verde são mais bem aceitos pela população e, conseqüentemente, mais valorizados comercialmente (FREIRE FILHO *et al.*, 2011).

Essa cultura é alimento básico para populações rurais e urbanas das regiões Norte e Nordeste. Além disso, a importância do feijão-caupi para os produtores está além da alimentação, inclui a geração de emprego e fonte de renda, o que lhe confere significativa importância socioeconômica (SOUZA *et al.*, 2011). Pequenos e médios produtores mantêm uma grande diversidade genética de cultivares locais ao produzirem suas sementes na região Meio-Norte. Essa grande diversidade genética da cultura, lhe confere boa adaptabilidade a diferentes condições ambientais (FREIRE FILHO *et al.*, 2005). O feijão-caupi destaca-se em relação a outras leguminosas, devido a boa adaptabilidade ao clima e solo variados, revelando um forte potencial de cultivo tanto na região Nordeste, como nas outras regiões do país (PINHO *et al.*, 2005).

Contudo, um dos fatores limitantes da cultura é o acometimento por vários fitopatógenos, dentre eles destaca-se as doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus, cuja ação parasitária afetam a qualidade e volume de produção, conseqüentemente causando graves perdas econômicas (EMBRAPA, 2011).

1.2.3 Doenças da cultura do feijão-caupi

Segundo Athayde Sobrinho *et al.* (2017), dentre as principais doenças fúngicas, para a cultura destacam-se a podridão-cinzenta causada pelo fungo *Macrophomina phaseolina*, a murcha causada pelos fungos do *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e *Sclerotium rolfsii*.

M. phaseolina é um fungo que habita o solo e continua seu ciclo colonizando o hospedeiro e ser disseminado através das sementes. Os sintomas iniciais da podridão-cinzenta causada *M. phaseolina* inicialmente exteriorizam-se no colo, podendo também serem observados nas partes superiores do caule e ramos primários. Esses sintomas consistem em lesões acinzentadas que evoluem para podridão dos tecidos chegando à degradação dos feixes vasculares. Podem ser observados nessas lesões pontuações negras, que são estruturas reprodutivas e de resistências do fungo, denominadas picnídios. Devido a destruição dos tecidos e feixes vasculares surge o amarelecimento, murcha, seca e morte das plantas. Quando existem alta incidência no solo ou fungo está associado à semente pode ocorrer morte de semente e damping-off de pré e pós-emergência de plântulas (ATHAYDE SOBRINHO, 2016).

O fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* habita naturalmente o solo, pode afetar a cultura do feijão-caupi, e sempre que infecta a semente e as plântulas ao germinarem, resultam em podridões de raiz, de colo e caule, com a conseqüente redução da população de plantas (estande) e dos rendimentos da cultura no campo. Essa podridão é caracterizada pela murcha vascular, afetando inicialmente o sistema vascular evoluindo para uma murcha repentina em toda a planta, na qual apresentam sintomas característicos externalizados na parte aérea como amarelecimento, murcha e queda de folhas, finalizando com a murcha da planta que conseqüentemente causa sua morte (TING *et al.*, 2012; YADAV *et al.*, 2021). Em condições propícias ao desenvolvimento da doença, pode-se observar, sobre as lesões um discreto crescimento micelial de cor branca (ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2017).

Sclerotium rolfsii é um patógeno capaz de permanecer latente por anos nos solos através de suas estruturas de resitência chamadas esclerócios. A doença causada por este fungo chama-se murcha de esclerócio ou podridão-de-esclerócio, os sintomas manifestam-se na planta inicialmente com a formação micelial na cor branca na região do colo da planta, essa formação micelial evolui para pequenas estruturas arredondadas inicialmente na cor branca que altera-se

para tons amarronzados. A colonização do patógeno e formação dessas estruturas causa desorganização dos tecidos e destruição do sistema vascular, conseqüentemente expressando sintomas como amarelecimento de folhas, murcha, seca e morte das plantas (ATHAYDE SOBRINHO, 2016).

De acordo com a literatura, para o controle dessa doença nas mais diversas culturas são tomadas medidas de manejo de acordo com o nível de dano econômico, dentre as formas de controle destaca-se o controle genético, químico, cultural, físico e o biológico (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2018).

Devido à preocupação cada vez mais crescente, com a qualidade alimentar, com os resíduos químicos que contribuem para a poluição ambiental e ainda com a resistência adquirida pelos fitopatógenos devido ao uso insistente de agrotóxicos, os estudos com produtos alternativos em substituição aos produtos químicos tradicionais têm se tornado uma excelente estratégia para a diminuição desses poluentes (BARBOZA *et al.*, 2013).

Dentre as formas de manejo ecologicamente sustentáveis, está o uso de variedades resistentes, a busca por estas variedades é constante, visto que o patógeno possui a capacidade de quebrar sua resistência quando são repetidamente cultivadas (NERE *et al.*, 2019). Além disso, é uma alternativa econômica para os produtores, não ameaça à saúde humana e ambiental, pode ser usada em conjunto com outras formas de controle e não gera resíduos tóxicos poluentes (MARSARO JÚNIOR; VILARINHO, 2011).

1.2.4 Qualidade fisiológica de sementes

Para garantir a eficiência dos sistemas produtivos a primeira e fundamental etapa é a escolha de sementes com alto potencial fisiológico. Tal condição é influenciada pela germinação e vigor destas. Sementes com alta qualidade fisiológica são mais aptas a alcançarem o máximo desempenho, mesmo em variações ambientais, dessa forma tornando-se plântulas com melhor desenvolvimento e uniformidade (SCHEEREN *et al.*, 2010).

Dessa forma, sementes de baixa qualidade geralmente estão comprometidas quanto a germinação e vigor, gerando estande de plantas frágeis conseqüentemente resultando em sérios prejuízos econômicos para o produtor (MARCOS FILHO, 2005).

Para tanto, são realizados testes de germinação, que é conduzido em condições controladas e responde sobre o desempenho de um determinado lote após semeadura (BRASIL, 2009). Mas somente a análise de germinação não responde em sua totalidade aos parâmetros necessários a uma plântula normal. Além desse teste, existem o de vigor. Plantas com alto

vigor resultam em plantas com maior poder de germinação e desempenho em campo, conseqüentemente, capazes de melhor estabelecerem e serem mais produtivas (SMANIOTTO *et al.*, 2014).

Ainda, para completar os testes de vigor temos o teste de condutividade elétrica, envelhecimento acelerado, teste de emergência e índice de velocidade de emergência que são utilizados para avaliar o vigor de lotes de sementes das mais diversas espécies.

A condutividade elétrica indica a integridade das membranas, ou seja, quanto menor o valor resultante do processo de embebição significa que houve menos liberação de solutos das sementes para o meio, logo maior será a integridade dessas membranas (ALBUQUERQUE *et al.*, 2001; MARCOS FILHO; NOVEMBRE, 2009). Com isso, lotes e/ou variedades que possuem maiores valores de condutividade elétrica apresentam sementes com mais elevados graus de deterioração e, por isso, menos vigorosas.

1.2.5 Sanidade de sementes

A sanidade de sementes está entre os parâmetros importantes para manter a qualidade dos cultivos, considerando que existem diversos fitopatógenos que comprometem a capacidade produtiva vegetal e que são transmitidas através das sementes comprometendo áreas de cultivo (ZANCAN *et al.*, 2015).

A transmissão de doenças através das sementes, podem ocasionar epidemias que conseqüentemente destroem a produção agrícola, e que em casos mais graves podem causar perdas totais, além de inviabilidade para cultivos futuros dessas áreas a depender do tipo de fitopatógenos. Pois alguns microorganismos produzem estruturas de resistência que perduram por décadas em solo aguardando as condições próprias para continuarem seus ciclos de infestação. Desse modo, o conhecimento da qualidade sanitária voltado para o tratamento das sementes configura-se uma estratégia fundamental no manejo integrado de doenças de plantas, multiplicando as chances de defesa vegetal, de sucesso do máximo potencial fisiológico como germinação, emergência e vigor, conseqüentemente trazem maiores chances de êxito para o estabelecimento em campo da cultura (PEREIRA *et al.*, 2016).

Além da proteção para o campo, o tratamento das sementes é utilizado para controlar fungos de armazenamento, que aceleram o envelhecimento e inviabilizam o potencial fisiológico ao longo do tempo de armazenamento. Essa estocagem é necessária tanto para preservar o banco de sementes quanto para garantir a próxima semeadura, essas condições de

armazenamento devem ser realizadas de modo que ocorram o mínimo de interferência possível sobre as condições fisiológicas e sanitárias (PEDROSO *et al.*, 2018).

No tratamento de sementes são usados produtos químicos e biológicos, porém, a inexistência de agroquímicos registrados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o tratamento das sementes de feijão-caupi reforça ainda mais a necessidade de pesquisas que preencham essa lacuna, com medidas viáveis e sustentáveis para a cultura, tanto para o armazenamento quanto para quebra de transmissão de inóculo para o campo que preservem a qualidade livre de fitotoxicidade independente do período armazenado (AVELAR *et al.*, 2011).

1.2.6 Biocontrole

Ainda seguindo a linha ambientalmente adequada, utiliza-se microrganismos naturalmente existentes na natureza a favor dos cultivos para o controle de patógenos. O controle biológico de doenças teve início há várias décadas, sendo este termo usado em 1931 (BAKER; COOK, 1974), e definido como “a redução das atividades patogênica ou do inóculo por meio de um microrganismo ou vários que não o homem” (COOK; BAKER, 1983).

A redução dessa atividade ocorre por meio de interações antagônicas, que são: antibiose, competição e parasitismo. Além disso, fazem parte do controle biológico as interações em que os microrganismos também promovem a preimunização e ativam mecanismos que induzem resistência. Esses agentes de controle podem usar mais de uma forma dos mecanismos supracitados (BEDENDO *et al.*, 2011).

O controle biológico é uma forma segura de controle quando comparado ao químico, devido ao menor impacto ambiental e a saúde humana, e ainda possui menor custo e é de fácil manejo. Desse modo, a investigação de microrganismos com potencial de uso do controle de doenças está sendo cada vez mais valorizado, com o intuito de aprimorar técnicas e ampliar as espécies estudadas (VAZ *et al.*, 2011).

Uma grande variedade de bactérias destaca-se como antagonistas a fungos, estes microrganismos ao sobreviverem na rizosfera em associação com as plantas, promovem uma série de benefícios a esses vegetais, dentre eles podem destacar-se: a promoção de crescimento e indução de resistência a estresses bióticos e abióticos. Isso ocorre devido a capacidade que possuem de produzirem substâncias que promovem essas ações, como enzimas e antibióticos (TAN *et al.*, 2013; YAMAMOTO *et al.*, 2015; ZOHORA *et al.*, 2016).

As rizobactérias do gênero *Bacillus*, pertencente à família *Bacillaceae*, são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas de tamanhos variáveis Gram positivos ou Gram negativos. Suas colônias são de cor branca cremosa, convexo com bordas regulares, possui crescimento lento e movimenta-se através dos cílios peritríquios. Forma a estrutura de resistência denominada endósporo (GOMES, 2013). Devido a sua versátil capacidade na produção de compostos antagônicos que garantem a sua sobrevivência em situações competitivas, espécies do gênero *Bacillus* acabam, conseqüentemente, com essa habilidade favorecendo o uso desses bioprodutos antagônicos contra os fitopatógenos (LANNA FILHO *et al.*, 2010).

Ao avaliar o efeito de isolados de *Bacillus* spp. sob estresse biótico (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* raça 3 e *Oidium* e abiótico (estresse salino) Albuquerque (2017) a partir de seus resultados, conclui que os isolados de *Bacillus* spp. promoveram o controle biológico e contribuíram com o desenvolvimento do tomateiro sob o estresse salino.

O trabalho de Fujimoto (2017) demonstrou o potencial de compostos orgânicos produzidos por *Bacillus* spp. no controle *in vitro* e *in vivo* de *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine), a autora considera esses resultados uma alternativa ao uso de fungicidas sintéticos para o controle da mancha preta dos citros.

Amaro *et al.*, (2018) ao avaliar o antagonismo de *Bacillus subtilis* versus *Colletotrichum gloeosporioides* observaram um efeito supressor dessa bactéria contra o patógeno em seus ensaios *in vitro*, e redução da severidade da antracnose *in vivo*, em frutos de pimenta em pós-colheita.

Brandão (2017) ao verificar a antibiose de *Bacillus methylotrophicus* contra *Bipolaris oryzae* observou a inibição *in vitro* do patógeno, porém não houve eficiência no controle *in vivo* da mancha parda em arroz.

Ao avaliarem a atividade antagônica *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus methylotrophicus* contra *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896), Almoneafy *et al.* (2012) indicam o uso de *Bacillus methylotrophicus* como agentes de biocontrole em casa de vegetação e promotor o crescimento do tomateiro.

E ainda, o uso de *Bacillus* spp. no tratamento via microbiolização das sementes tem demonstrado bons resultados (ROCHA *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2019). Diversos trabalhos relatam o potencial das bactérias do gênero *Bacillus* spp. como promotores de melhoria no desenvolvimento vegetal (ESPÍNDOLA, 2017); redução da severidade da doença nas plantas (LUDWIG *et al.*, 2009; ZAHORA *et al.*, 2016), inibição da transmissão do fitopatógeno para

plantas através das sementes, abortando o desenvolvimento do fungo nesse órgão (CORRÊA *et al.*, 2008).

Estudos atestam a capacidade que bactérias do gênero *Bacillus* spp. possuem de eliciar moléculas que desencadeiam o processo de resistência sistêmica induzida nas plantas, descrevendo os mecanismos responsáveis presentes contra doenças fúngicas (CAMPOS NETO *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2012) e bacterianas (TAN *et al.*, 2013; YAMAMOTO *et al.*, 2015).

1.2.7 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

Para um melhor desempenho agrônomico a favor de maior produtividade das espécies vegetais faz-se o uso da adubação nitrogenada, o nitrogênio é um elemento necessário em grandes quantidades, conseqüentemente a sua insuficiência compromete a qualidade e volume de produção (MUMBACH *et al.*, 2017).

O uso de *Bradyrhizobium* é uma excelente alternativa para suprir a necessidade da planta por nitrogênio, devido a sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, essa bactéria em simbiose com o vegetal além de suprir essa necessidade nutricional, ainda é capaz de melhorar diversos outros processos fisiológicos que resultam em melhoria do desempenho agrônomico (HUNGRIA, 2011).

O gênero *Bradyrhizobium*, pertence à família *Bradyrhizobiaceae*, é composto por bactérias Gram negativas que possuem formato de bastonete e movimentam-se por meio de dois flagelos (um polar e outro subpolar). Seu crescimento é lento e produz um muco de consistência variada, que em muitos casos ajudam a diferenciar as espécies, essa e outras características como a capacidade de nodulação, resistência a antibióticos e diferentes compostos produzidos são usadas para diferenciá-las (VANLINSBERGHE *et al.*, 2015). Este gênero é reconhecidamente membro do grupo das bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), além da capacidade biológica de fixação de nitrogênio, essas bactérias também promovem o aumento da atividade de diversas enzimas importantes no processo bioquímico da planta, que atuam como inibidores da ação de patógenos, aumento da produção de hormônios de crescimento entre outras funções (HUNGRIA, 2011).

Araújo *et al.*, (2012) avaliaram o efeito da inoculação em conjunto de *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi, porém concluíram que o efeito de *Bacillus subtilis* isoladamente proporciona um maior crescimento e fixação de nitrogênio, e a inoculação apenas com a estirpe de *Bradyrhizobium*, aumenta a nodulação da planta. Não houve incremento desses parâmetros nos tratamentos que receberam a coinoculação. Para a coinoculação

Bradyrhizobium/Azospirillum os resultados obtidos por Chibeba *et al.* (2015), foram favoráveis para o aumento da nodulação em plantas de soja, isso ocorreu devido a precoce nodulação.

Lima *et al.*, (2011) observaram um sinergismo a partir da coinoculação de estirpes de *Bacillus* sp./ *Bacillus pumilus* com *Bradyrhizobium* sp. em plantas de feijão-caupi sob condições de casa de vegetação. Rodrigues *et al.*, (2012) também observaram respostas significativas em seus resultados usando *Bacillus* coinoculados com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. na cultura do feijão-caupi, ao avaliar a altura de planta, comprimento da raiz, matéria seca da parte aérea, matéria seca da raiz, matéria seca do nódulo, nodulação específica e nitrogênio acumulado na parte aérea em condições de casa de vegetação. Esses resultados favorecem a hipótese de que essa pode ser uma interação benéfica em prol da melhoria da produtividade e indução de resistência a doenças, porém precisam ser validadas por meio de mais pesquisas, que incluam variáveis envolvidas nos processos bioquímicos dessa interação quanto ao potencial em induzir resistência a doenças.

Além disso, as pesquisas precisam ser desenvolvidas e avaliadas nas condições de campo, nas mais variadas condições climáticas específicas de cada região promissora ao cultivo do feijão-caupi com a finalidade de buscar alternativas para mitigar a baixa produtividade das cultivares biofortificadas.

Com base no levantamento de literatura, realizado até o presente momento, nenhum trabalho avaliou de modo aprofundado os efeitos do uso de rizobactérias (*Bacillus methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp.) sobre cultivares biofortificadas e tradicionais de feijão-caupi, principalmente nas condições de campo e da perspectiva do efeito contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Sclerotium rolfsii* e a *Macrophomina phaseolina*, já que é comprovado o efeito antagonista patogênico ocasionado por microrganismos do gênero *Bacillus*.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. 2022. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Available at: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Access on: Dez. 19. 2022.
- ALBUQUERQUE, C. A. C. **Potencial de *Bacillus* spp. no controle de estresses biótico e abiótico e na promoção de crescimento de tomateiro.** 89 p. Dissertação (Mestre em Agronomia) (Proteção de Plantas) Universidade Estadual Paulista, “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2017.
- ALBUQUERQUE, M. C. F. et al. Teste de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p. 01-08, 2001.
- ALMEIDA, E. B.; OLIVEIRA, J. P.; SOUSA, R. A. C.; CHAVES, R. P. **Feijão-caupi: tecnologias de produção para o mercado nordestino.** Embrapa Meio-Norte, Circular Técnica 138, 2021.
- ALMONEAFY, A. A. et al. Characterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potential plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.28, p.7193-7201, 2012.
- ALVES, L. V. F. V. **Estratégias de adubação com zinco para biofortificação agrônômica do feijão-caupi.** 2017. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) - Faculdade de Agronomia e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2017.
- AMARO, J. K. C.; VIEIRA, B. S.; SOUSA, L. A. Biological control of *Colletotrichum gloeosporioides* in pepper with isolates of *Bacillus subtilis*. **Brazilian journal of agriculture**, v. 93, n. 2, p. 195-209, 2018.
- ARAÚJO, B.; PERUCH, L. A.M.; STADNIK, M. J. Efeito do extrato de alga e da argila silicatada na severidade da alternariose e na produtividade da cebolinha comum (*Allium fistulosum* L.). **Tropical Plant Pathology**, v. 37. p. 363-367. 2012.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. Doenças fungicas *In*: CARDOSO, M. J.; BASTOS, E. A.; ANDRADE JÚNIOR, A. S.; ATHAYDE SOBRINHO, C. (Org.). **Feijão-caupi: o produtor pergunta, a Embrapa responde.** Brasília, DF: Embrapa, 2017, p. 90 – 114.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil. *In*: BASTOS, E. A. **A cultura do feijão-caupi no Brasil.** 1 ed. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2016.
- AVELAR, S. A. G.; BAUDET, L.; PESKE, S. T.; LUDWING, M. P.; RIGO, G. A., CRIZEL, R. L.; OLIVEIRA, O. Armazenamento de sementes de soja tratadas com fungicida, inseticida e micronutriente e recobertas com polímeros líquido e em pó. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.10, p.1719-1725, 2011.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. **Biological control of plant pathogens.** W.F. Freeman, San Francisco. 1974.
- BARBOZA, H. T. G.; COSTA, J. B. N.; SOARES, A. G.; SARQUIS, M. I. M. SILVA, O. F. LIRA, A. F. ALCÂNTARA, I. Controle de patógenos pós-colheita de mamão (*Carica papaya* L.) pela utilização das fosforilidrazonas: um estudo de caso. **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 21, 2013.

- BARRETO, A. L. H.; FRANCO, L. J. D.; MOURA, R. M.; SANTOS, A. C.; MEDEIROS, A. M.; ASSUNÇÃO FILHO, JOSÉ R.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; FREIRE FILHO, F. R.; NUTT, M. R.; CARVALHO, J. L.V. **Avaliação dos conteúdos de ferro, zinco e proteína em linhagens de feijão-caupi tipo verde**. 3ª Reunião Anual de Biofortificação no Brasil Aracaju – Sergipe. 2009.
- BEDENDO, I. P.; MASSOLA Jr, N. S.; AMORIM, L. Controles cultural, físico e biológico de plantas. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M. BERGAMIN FILHO, A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. 4 ed. São Paulo: Ceres, 2011. v. 1. p. 367-388.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. MANEJO INTEGRADO DE DOENÇAS. In: AMORIM, L., REZENDE, J. A. M., BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 303-309. 2018.
- BEZERRA, M. S., JACOB, M. C. M., FERREIRA, M. A. F., VALE, D., MIRABAL, I. R. B., LYRA, C. D. O. Insegurança alimentar e nutricional no Brasil e sua correlação com indicadores de vulnerabilidade. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, p. 3833-3846, 2020.
- BIGATON, D.; BACCHI, L. M. A.; FORMAGIO, A. S. N.; GAVASSONI, W. L.; ZANELLA, C. S. Avaliação da atividade fungicida de extratos e óleos essenciais sobre ferrugem asiática da soja. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 757-763, 2013.
- BRANDÃO, D. F. R. **Isolamento de microrganismos antagonistas de solo para o controle de Bipolaris oryzae, agente causal da mancha parda em arroz**. 79 p. Dissertação (Mestre em Ciências), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2017.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 395p, 2009.
- BRASIL. Medida provisória no 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 1997. Seção 1, p. 29514. 2017.
- CALDAS, N.V.; SACCO DOS ANJOS, F.; BEZERRA, A.J.A.; CRIADO, E.A. Certificação de Produtos Orgânicos: obstáculos à implantação de um sistema participativo de garantia na Andaluzia, Espanha. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, vol. 50, n. 3, p. 455-472. 2012.
- CAMPOS NETO, J. R. M.; CHAVES, R. R.; SARDINHA, D. H. S.; MELO, G. DE L. LUIZ.; RODRIGUES, A. A. C. Bacterial formulations in induction of resistance and growth promotion of tomato plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 10, 2018.
- CARVALHO, L. C. B.; SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; FRANCO, L. J. D.; SILVA, L. R. A.; CARVALHO, J. S.; SOUSA, C. M. B.; PIRES, C. J. **Obtenção de populações de feijão-caupi visando a biofortificação para os teores de ferro, zinco e proteína**. IV Reunião de biofortificação. 2011.
- CHIBEBA, A. M.; GUIMARÃES, M. F.; BRITO, O. R.; ARAÚJO, R. S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Inoculação de soja com *bradyrhizobium* e *azospirillum* promove nodulação precoce. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA. 2015, **Resumos...** Santa Catarina.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. SAFRA 202/2- N. 2 - Segundo levantamento, v. 6, n. 4. Brasília. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 18 nov. 2022.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. **The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens**. St. Paul, USA: APS Press, 1983, 539p.

CORRÊA, B. O.; MOURA, A. BITTENCOURT; DENARDIN, N. D'ÁVILA.; SOARES, V. N.; SCHÄFER, J. T.; LUDWIG, JULIANE. Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* (Saac e Magn.). **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 30, nº 2, 2008.

DA SILVA PINHEIRO, A., DA SILVA, V. M. B., LEMOS, Y. S., DA CUNHA, L. N. A., ANDRADE, R. A., DE SALES SANTOS, B. M., DA SILVA, L. M. C. Insegurança alimentar em tempos de Pandemia do Covid-19 no Brasil: Revisão de literatura. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e28411931809-e28411931809, 2022.

EMBRAPA. Circular Técnica, nº 51. **Cultivo do Feijão-caupi em Sistema Agrícola Familiar**. Embrapa Meio-Norte. Teresina, PI, p. 15. 2011.

ESPÍNDOLA, G. M. **Promoção de crescimento na cana-de-açúcar infectada por *Ceratocystis paradoxa* com fungo e bactérias antagonistas**. Trabalho de conclusão de curso. Minas Gerais - Universidade Federal de Uberlândia. Monte Carmelo. 2017.

FILGUEIRAS, G. C.; SANTOS, M. A. S.; HOMMA, A. K. O.; REBELLO, F. K.; CRAVO, M. S. Aspectos socioeconômicos. In: ZILLI, J. E.; VILARINHO, A. A.; ALVES, J. M. A. **A cultura do feijão-caupi na Amazônia Brasileira**. 1 ed. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2009. 355 p.

FONSECA, M. C. M.; LEHNER, M. S.; GONÇALVES, M. G.; PAULA JÚNIOR, T. J.; SILVA, A. F.; BONFIM, F. P. G.; PRADO, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Planta Medicinal**, v.17, n.1, p.45-50, 2015.

FRANCO, L. J. D.; BARRETO, A. L. H.; ROCHA, F. B.; SANTOS, A. C.; MEDEIROS, A. M.; ASSUNÇÃO FILHO, J. R.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; FREIRE FILHO, F. R.; NUTTI, M. R.; CARVALHO, J. L.V. **Avaliação dos teores de ferro, zinco e proteína em linhagens de feijão-caupi tipo fradinho**. III Reunião Anual de Biofortificação no Brasil. Aracaju – Sergipe. 2009.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, D. P.; SANTOS, A. A. Melhoramento Genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. 1 ed. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2005. 519 p.

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. 1 ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84 p.

FUJIMOTO, A. **Identificação de compostos orgânicos voláteis e antibióticos produzidos por *Bacillus* spp. envolvidos no controle da mancha preta dos citros**. Tese de Doutorado. Jaboticabal. Unesp. Jaboticabal, 2017.

GOMES, J. P. **Gênero *Bacillus* spp.** Tópicos em Bacteriologia Veterinária, Porto Alegre, 2013.

GRISA, C. **Políticas públicas para a agricultura familiar no Brasil: produção e institucionalização das ideias**. 281 p. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Rio de Janeiro, 2012.

- HUANG, C.; TSAY, J.; CHANG, S.; YANG, H.; WU.; CHEN, C. Dimethyl disulfide is an induced systemic resistance elicitor produced by *Bacillus cereus* C1L. **Revista Pest Manag Society of Chemical Industry**. 2012.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 36 p. (Documentos, 325). 2011.
- KISAKYE, A. N.; NAFULA, G. A.; JONES, A. D.; FRANCO, C. K. M.; NARROD, C. A.; ANUNDA, J. K. K.; OWINO, O. V.; NIELSEN, J. Farming for improved nutrition: A mixed-methods assessment of smallholder farmers agricultural practices and dietary diversity in Uganda. **Plos one**, v. 17, n 1, 2022.
- LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.
- LIMA, A. S. T.; BARRETO, M. C. S.; ARAÚJO, J. M.; SELDIN, L.; BURITY, H. A.; FIGUEIREDO, M. V. B. SINERGISMO *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* NA SIMBIOSE Bradyrhizobium-CAUPI. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, 2011.
- LUDWIG, J.; MOURA, A. B.; SANTOS, A. S. DOS.; RIBEIRO, A. S. Microbiolização de sementes para o controle da mancha-parda e da escaldadura em arroz irrigado. **Revista Tropical Plant Pathology**. V. 34. n. 5. 2009.
- MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.
- MARCOS FILHO, J.; NOVENBRE, A. D. L. C. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de hortaliças**. In: NASCIMENTO, W.M. (Ed.). Tecnologia de sementes de hortaliças. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 185-246p. 2009.
- MARSARO JÚNIOR, A. L.; VILARINHO, A. A. Resistência de cultivares de feijão-caupi ao ataque de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em condições de armazenamento. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais (Online)**, v. 9, n. 1, 2011.
- MUMBACH, G. L., KOTOWSKI, I. E., SCHNEIDER, F. J. A., MALLMANN, M. S., BONFADA, E. B., PORTELA, V. O., KAISER, D. R. Resposta da inoculação com *Azospirillum brasilense* nas culturas de trigo e de milho safrinha. **Revista Scientia Agraria**, v. 18, n. 2. 2017.
- NERE, D. R.; SILVA, L. C.; FERREIRA, A. D. C. L.; BLEICHER, E.; BERTINI, C. H. C. M. Identificação de variedades locais de feijão-de-corda resistentes ao pulgão-preto por diferentes análises estatística. **Acta Iguazu**, v.8, n.2, 2019.
- NUTTI, M.; CARVALHO, J. L. V.; WATANABE, E. **A biofortificação como ferramenta para combate a deficiências em micronutrientes**. 2010. Disponível em: http://www.cprm.gov.br/publique/media/geo_med7.pdf. Acesso em: 17/05/2019.
- OLIVEIRA, A. C. M.; RIBEIRO, N. D.; SILVA, K. P.; RIBEIRO, T. P.; SILVA, M. R.; SANTOS, M. P. G. Composição química de grãos de feijão-caupi cultivados no Cerrado brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, 2021.
- PEDROSO, D. C.; LEMES, E. L.; OLIVEIRA, S. de.; TUNES, L. M. de.; JUNGES, E.; MUNIZ, M. F. B. Tratamento químico e biológico: qualidade fisiológica e sanitária de sementes de cenoura durante o armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, Recife, v.23, n.1, p.173, 2018.

- PEREIRA, L. C.; GARCIA, M. M.; BRACCINI, A. L.; PIANA, S. C.; FERRI, C. G.; MATERA, T. C.; FELBER, P. H.; MARTELI, D. C. V. Efeito da adição de biorregulador ao tratamento industrial sobre a qualidade de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merr.) aos sessenta dias de armazenamento convencional. **Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales**, v.3, n.2, p.15-22, 2016.
- PEREZ, A. P. F. 2015. **Vigna in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB83865>>. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411) acessado em 19/06/2019.
- PIMENTEL, M. A. G.; FARONI, L. R. D. A.; SILVA, F. H.; BATISTA, M. D.; GUEDES, R. N. C. Spread of phosphine resistance among brazilian populations of three species of stored products insects. **Neotropical Entomology**, v.39, n.1, p.101-107, 2010.
- PINHO, J. L. N.; TÁVORA, F. J. A. F.; GONÇALVES, J. A.; Aspectos fisiológicos. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. 1 ed. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2005. 519 p.
- ROCHA, D. J. A.; CORRÊA, B.O.; BUSS, R.B.; MOURA, A.B. **Avaliação do potencial de rizobactérias para o biocontrole de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* agente da murcha bacteriana do feijão**. CIC XI EPOS I Mostra Científica. Disponível em: http://www.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01571.pdf. Acesso em 10 de novembro de 2019.
- ROCHA, L. A.; VIEIRA, B. S.; MOTA, L. C. B. M.; LOPES, E. A. Potencial de isolados de *Bacillus* sp. para o controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Ciência Agrícola**, Rio Largo, v. 14, n. 1, p. 45-50, 2016.
- ROCHA, M. MOURA; ALMEIDA, M. J. O.; SILVA, K. J. D.; NEVES, A. C. Biofortificação do feijão-caupi. Brasília, DF. Embrapa. 2014.
- RODRIGUES, A. A. C.; BARBOSA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de Resistência a *Fusarium Oxysporum* f. sp. *Tracheiphilum* em Caupi: Eficiência de Indutores Abióticos e Atividade Enzimática Elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31. p. 5. 2006.
- RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Revista Bioscience Journal**, v. 28, 2012.
- SANTOS, A. M. F.; CARVALHO, JOSÉ L. V.; ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, K. J. D. **Multiplicação e avaliação de linhagens e cultivares de feijão-caupi ricos em ferro e zinco no município de Arari, MA**. III Reunião Anual de Biofortificação no Brasil. 2009.
- SCHEEREN, B. R., PESKE, S. T., SCHUCH, L. O. B., BARROS, A. C. A. Qualidade 18 fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, n.3, p.35-41, 2010.
- SILVA, P. H. S.; ATHAYDE SOBRINHO, C. Pragas In: CARDOSO, M. J.; BASTOS, E. A.; ANDRADE JÚNIOR, A. S.; ATHAYDE SOBRINHO, C. (Org.). **Feijão-caupi: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa, 2017, p. 90 – 114.
- SMANIOTTO, T. A. D. S.; RESENDE, O.; MARÇAL, K. A.; DE OLIVEIRA, D. E.; SIMON, G. A. Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes

condições. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 446-453. 2014.

SOUZA, L. S. B.; MOURA, M. S. B.; SEDIYAMA, G. C.; SILVA, T. G. F. Eficiência do uso da água das culturas do milho e do feijão-caupi sob sistemas de plantio exclusivo e consorciado no semiárido brasileiro. **Bragantina**, Campinas, v. 70, n. 3, p.715-721, 2011.

TAN, S.; DONG, Y.; LIAO, H.; HUANG, J. SONG, S.; XU, Y., SHEN, Q. Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. **Revista Pest Manag Society of Chemical Industry**. 2013.

TING, A.S.Y., MAH, S.W., TEE, C.S., Evaluating the feasibility of induced host resistance by endophytic isolate *Penicillium citrinum* BINFECTED08 as a control mechanism for *Fusarium* wilt in banana plantlets. **Biol. Contr**, 61, 155–159. 2012.

THAVARAJAH, D. et al. Phytic acid and Fe and Zn concentration in lentil (*Lens culinaris* L.) seeds is influenced by temperature during seed filling period. **Food Chemistry**, v. 122, 2010.

UNICEF. The State of the World's Children 2019: Children, Food and Nutrition - Growing well in a changing world. Disponível em: <https://www.unicef.org/reports/state-of-worlds-children-2019>. Acesso em 23 de fev. 2023.

VANLNSBERGHE, D.; MAAS, K.; CARDENAS, E. *Nonsymbiotic Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. **Revista The Isme Journal**, v. 9: 2015.

VAZ, M.V.; CANEDO, E.J.; MACHADO, J.C.; VIEIRA, B.S. & LOPES, E.A. Controle biológico de *Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita* com *Bacillus subtilis*. **Perquirere**, v. 1 n. 8: 203-212. 2011.

YAMAMOTO, S.; SHIRAISHI, S.; KAWAGOE, Y.; MOCHIZUKI, M.; SUZUKI, S. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato. **Pest Management Science**, v. 71, n. 5, p. 722-727, 2015.

YADAV, K. et al. Effective biocontrol of banana fusarium wilt tropical race 4 by a bacillus rhizobacteria strain with antagonistic secondary metabolites. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100341, 2021.

ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; BAUTE, N. L.; SOUSA, B. F. M. de. Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled conditions. *Bioscience Journal*, Londrina, v.31, n.3, p.775-784, 2015.

ZOHORA, U. S.; ANO, T.; RAHMAN, M. S. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by Iturin A Producer *Bacillus subtilis* RB14 Seed Treatment in Tomato Plants. **Revista Advances in Microbiology**, v. 6. 2016.



CAPÍTULO II

CAPÍTULO II - Estudo comparativo da qualidade fisiológica e sanitária de sementes tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi

Artigo escrito de acordo com as normas da revista “Revista Caatinga”

ESTUDO COMPARATIVO DA QUALIDADE FISIOLÓGICA E SANITÁRIA DE SEMENTES TRADICIONAIS E BIOFORTIFICADAS DE FEIJÃO-CAUPI

¹LARISSE RAQUEL CARVALHO DIAS,¹RUAN ITHALO FERREIRA SANTOS CAVALCANTE,¹LUKAS ALLAYN DINIZ CORREA,¹ANNA CHRISTINA SANAZÁRIO DE OLIVEIRA,¹ANTÔNIA ALICE COSTA RODRIGUES

¹Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade. CCA/UEMA.

RESUMO

O feijão-caupi é uma das principais culturas da agricultura familiar, especialmente da região Nordeste, e encontra-se em expansão para as demais regiões do Brasil. O uso de sementes com baixa qualidade fisiológica e sanitária refletem no desenvolvimento das plantas e consequentemente na produtividade. Desse modo ressalta-se a importância do estudo da qualidade fisiológica e sanitária das sementes. Esse trabalho objetivou avaliar a fisiologia e sanidade de sementes tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi. As variedades tradicionais (Angeim, Mercado e Manteguinha) e as biofortificadas (BRS Aracê, BRS Xique-Xique e BRS Tumucumaque) de feijão-caupi foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros fisiológicos: Teor de água (T.A), Primeira contagem (PC), Teste de germinação (G), Índice de velocidade de germinação (IVG), Emergência de plântulas em casa de vegetação (E), Índice de velocidade de emergência (IVE) Comprimento da parte aérea e raiz da mudas (CPA e CR) e Teste de Condutividade Elétrica (CE). Para avaliação da qualidade sanitária das sementes foi adotado o *Blotter Test*. O teor de água presente nas sementes das variedades tradicionais e biofortificadas, encontra-se entre 10% a 14%. Todas as variedades tradicionais e biofortificadas apresentaram alto valor de germinação e emergência em casa de vegetação. O índice de velocidade de germinação e emergência indicaram as cultivares BRS Aracê e BRS Xique-Xique as mais vigorosas. Nos testes de sanidade a maior incidência foram dos fungos de armazenamento *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e o *Penicillium* sp., com maior prevalência na variedade BRS Tumucumaque, provavelmente relacionado ao maior teor de água presente nessa variedade.

Palavras chaves: *Vigna unguiculata*. Germinação. Vigor. Fungos de Armazenamento.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma cultura em expansão no Brasil, a maior parte da produção está concentrada na região Norte e Nordeste. Sua produção no país é estimada em cerca de 630,8 mil t na safra 2021/2022 (CONAB, 2022). Com a expansão da área de plantio dessa cultura, fica ressaltado a importância do uso de sementes de qualidade nos plantios, pois o sucesso desses sistemas tem início na escolha de sementes adequadas.

A semente está entre os insumos de maior importância, seja qual for o sistema produtivo agrícola. De acordo com Munizzi et al. (2010), as sementes que apresentam elevado vigor possuem maior velocidade nos processos metabólicos, promovendo a emissão mais rápida e uniforme da raiz primária no processo de germinação e maior taxa de crescimento, produzindo plântulas com maior tamanho inicial.

A agricultura familiar, responsável pela maior parte da produção do feijão-caupi, muitas vezes faz uso de sementes de variedades tradicionalmente cultivadas na região, cuja importância genética consiste no potencial para melhoramento de outras cultivares (GOMES FILHO et al., 2017). Além das variedades tradicionais, existem as cultivares biofortificadas, que possuem maiores teores de ferro, zinco e proteína (ROCHA et al., 2014), estas são características resultantes do processo de biofortificação nutricional da cultura que surgiu como uma das estratégias para que o consumo de nutrientes, principalmente micronutrientes, atingisse os valores mínimos, sobretudo pela parcela mais carente da população, que, conseqüentemente, mais sofre com os déficits nutricionais (GONÇALVES et al., 2015).

A avaliação da qualidade fisiológica é um componente essencial para controle de uso adequado das sementes, fornecendo informações para a detecção e solução de problemas durante o processo produtivo e, também, sobre o desempenho das sementes (MARCOS FILHO, 2015). A qualidade das sementes influenciam na sua capacidade germinativa, vigor e conseqüentemente na produtividade, sendo consideradas sementes de alta e boa qualidade as que possuem estes requisitos elevados, tratadas de modo apropriado, com boa aparência e grau de umidade adequado (SILVA et al., 2021). Entre os testes mais utilizados estão o índice de velocidade de germinação, teste de frio, índice de velocidade de emergência e emergência em campo.

Associados a qualidade das sementes, está a necessidade do conhecimento das doenças que acometem o feijão-caupi, potencialmente transmitidas através das sementes. Diversas doenças fúngicas como a podridão cinzenta do caule, murchas, podridões de fusário e

esclerócio, por exemplo, podem causar morte de plantas que prejudicam ao longo de todo o ciclo da cultura reduzindo a produtividade (ATHAYDE SOBRINHO, 2016). Diante disso, a avaliação da qualidade sanitária das sementes é um dos aspectos que mais merece atenção nos sistemas produtivos, a detecção desses organismos torna-se uma das mais importantes ferramentas no manejo fitossanitário de doenças e disseminação das doenças em novas áreas de plantio (BARROCAS; MACHADO, 2010).

Embora alguns autores tenham verificado aspectos da qualidade sanitária (RODRIGUES; MENEZES, 2002; SILVA, 2006) e fisiológica de sementes de feijão-caupi (SILVA, 2011; ASSIS et al., 2019; DA SILVA et al., 2019; RAISSE et al., 2020) são escassas informações sobre estudo comparativo entre variedades tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi. Por isso, torna-se fundamental o conhecimento da qualidade das sementes utilizada nos plantios para aprimorar a eficiência na produção dessa cultura, principalmente para pequenos agricultores. Desse modo, esse trabalho objetivou comparar o perfil fisiológico e sanitário de sementes tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi.

METODOLOGIA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitopatologia e casa de vegetação da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus Paulo VI, São Luís, coordenadas 2° 59'19" S, 44° 21'20" W, no período de março a setembro de 2020.

As sementes tradicionais foram obtidas de propriedades produtoras de feijão-caupi na comunidade Angelim, do município de Balsas/MA, os genótipos coletados foram a Angelim, Mercado e Manteguinha. As sementes biofortificadas foram as cultivares BRS Aracê, BRS Xique-xique e BRS Tumucumaque, cedidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa em Agropecuária (EMBRAPA Meio-Norte e EMBRAPA Cocais).

Para avaliação da qualidade fisiológica de sementes tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi foram realizados os testes: a) Teor de água - expresso em base úmida foi determinado segundo as prescrições das Regras de Análise de Sementes -RAS (BRASIL, 2009a), pelo método de estufa a 105 ± 3 °C, durante 24h. b) Primeira contagem das sementes – a avaliação foi realizada no quinto dia após a montagem do teste, o resultado foi expresso em percentagem de plântulas normais. c) Teste de germinação - realizado de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009a). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes, distribuídas sobre duas folhas e recobertas com uma terceira folha de papel germitest, formando rolos que foram umedecidos com água destilada. Os rolos foram colocados no interior

de sacos de polietileno, para manter a umidade e levados para germinadores do tipo BOD, a temperatura de 26°C, de acordo com a RAS. A avaliação das plântulas foi realizada ao quinto dia, para primeira contagem, e oitavo dia, contagem final, sendo os resultados obtidos, expressos em percentagem de plântulas normais. d) Índice de velocidade de germinação – realizado durante a condução do teste de germinação, foi avaliado todos os dias, a partir da emissão da radícula até o dia da última contagem estabelecida pelas RAS (BRASIL, 2009a) para a germinação da cultura do feijão-caupi. Para o cálculo, foi utilizada a fórmula proposta por Maguire (1962).

Ainda foram avaliados: e) Emergência de plântulas em casa de vegetação - realizada com quatro repetições de 50 sementes, utilizando-se como substrato areia autoclavada, em casa de vegetação. Para a avaliação considerou-se as plântulas emergidas presentes, expressando-se o resultado em percentagem (VIEIRA; CARVALHO, 1994). f) Índice de velocidade de emergência – foi realizado em conjunto com o teste de emergência de plântulas e a contagem foi realizada diariamente, a partir da primeira plântula emergida. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado segundo Maguire (1962). g) Comprimento da parte aérea e raiz das mudas: o comprimento da parte aérea da plântulas foi medida, utilizando-se uma régua graduada em milímetros, desde a inserção do colo até o ápice do broto apical. O comprimento da raiz foi medido desde a inserção do colo até o final da raiz principal, as medições foram tomadas ao final do teste de germinação de 20 mudas aleatórias. Os resultados foram expressos em cm. h) Teste de Condutividade Elétrica - realizado com quatro repetições de 50 sementes colocadas em copos de plástico de 200 ml, acrescentados de 75 ml de água deionizada e acondicionados em uma germinadora tipo BOD a 25°C por 24h. Após este período foi realizada a leitura de condutividade elétrica na solução de embebição utilizando um condutivímetro (VIEIRA; CARVALHO, 1994).

Para avaliar a qualidade sanitária das sementes foi adotado o método *Blotter Test* de acordo com o Manual de Análise Sanitária de Sementes (BRASIL, 2009b). Inicialmente, as amostras das sementes foram desinfestadas por cinco minutos através de imersão em uma solução de hipoclorito de sódio (NaOCl), com 1,5 % de cloro ativo, seguida de duas lavagens com água esterilizada.

Em seguida, as sementes foram plaqueadas em caixas plásticas tipo “gerbox”, previamente desinfestadas por exposição à luz ultravioleta (UV), durante 20 minutos, contendo duas camadas de papel de filtro esterilizado e umedecido com água destilada esterilizada. A

amostra de trabalho foi composta de 200 sementes por cultivar empregando-se 25 sementes por “gerbox”. As sementes foram incubadas em condições de fotoperíodo de 12h, à temperatura de aproximadamente 25 ± 2 °C, durante sete dias.

Os fungos foram identificados pelas características morfológicas observadas por microscópios estereoscópicos e ópticos. Quando não possível a identificação direta do fungo, as colônias que se desenvolveram sobre as sementes foram transferidas para meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (BDA), além do preparo de microculturas para sua posterior identificação de acordo com as estruturas reprodutivas e vegetativas, através das chaves dicotômicas: Dematiaceous Hiphomycetes (ELLIS, 1971), The Fusarium Laboratory Manual (LESLIE; SUMMERELL, 2006), Illustred genera of imperfect fungi (BARNETT; HUNTER, 1998).

O desenho experimental foi em delineamento inteiramente casualizado, seis variedades com quatro repetições. Os dados das análises fisiológicas foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas usando o teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software INFOSTAT (DI RIENZO et al., 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água das sementes de feijão-caupi entre as variedades tradicionais variaram de 10,6% a 11,62%, e entre as variedades biofortificadas de 11,13% a 14,93% (Tabela 1). Valores semelhantes (10,52% a 12,15%), foram encontrados para variedades crioulas de feijão-caupi cultivadas no Rio Grande do Norte (DA SILVA et al., 2019). As cultivares biofortificadas BRS Aracê e BRS Tumucumaque apresentaram maiores valores de teor de água dentre todas as variedades testadas. Para Bragantini (2005), quando a umidade de armazenamento do feijão está entre 11% a 13%, é baixo o processo respiratório, evitando-se assim a deterioração das sementes e mantendo-se sua qualidade fisiológica.

Segundo Carvalho e Nakagawa (2012), o armazenamento de sementes com teores de água entre 12 a 14% permite que haja uma degradação das mesmas por meio do processo de respiração, favorecendo também o aparecimento de microrganismos fitopatogênicos. No entanto, as sementes das cultivares BRS Tumucumaque e BRS Aracê apresentaram alto poder germinativo mesmo com esse teor de água, 14,93% e 13,2% respectivamente (Tabela 1). Considerando nossos dados, a umidade não interferiu na germinação. Provavelmente estes aspectos estão relacionados ao tempo de colheita, processamento e armazenamento das sementes.

Todas as variedades tradicionais e cultivares biofortificadas apresentaram porcentagem mínima de germinação de pelo menos 94% (Tabela 1), estando dentro do padrão determinado pela Instrução Normativa do Ministério da Agricultura (BRASIL, 2013), o qual estabelece os padrões de identidade e qualidade para a produção e a comercialização de sementes das grandes culturas agrícolas, determinado porcentagem mínima de 80% de germinação. Os dados da primeira contagem, nos revelam que todas as variedades e cultivares já apresentavam germinação superior a 80%, após o quinto dia de contagem realizado nos testes (Tabela 1). Segundo a Associação Brasileira de Sementes e Mudanças ABRASEM (2022), todas as variedades e cultivares avaliadas nesta pesquisa estão dentro do padrão de germinação de 80%. Esses dados evidenciam o potencial dessas variedades tradicionais e cultivares biofortificadas estudadas.

Da Silva et al. (2019) obtiveram valores para os resultados de germinação acima do padrão para três das seis variedades crioulas de feijão-caupi estudadas. No estado do Ceará, Gomes et al. (2008) avaliando o potencial germinativo de sementes de feijão-caupi produzidas, observaram que todas as sementes das doze variedades estavam abaixo do valor padrão.

Tabela 1: Valores médios do Teor de água (T.A); Germinação (G); Índice de velocidade de germinação (IVG); Comprimento de radícula (CR) e Comprimento de parte aérea (CPA) das variedades tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi

VARIEDADES						
TRADICIONAIS	T. A (%)	G (%)	PC (%)	IVG	CR (cm)	CPA(cm)
Angelim	10,89 a	95,5 ab	88,0	11,83 c	13,09 a	9,74 ab
Mercado	11,22 a	95,0 ab	88,0	11,82 c	11,91 a	9,01 a
Manteiguinha	10,60 a	99,0 ab	97,0	12,35 c	12,30 a	11,88 b
BIOFORTIFICADAS						
BRS Aracê	13,20 b	100,0 a	97,0	16,57 a	12,10 a	12,11 b
BRS Xique-Xique	11,13 a	99,0 ab	100,0	16,32 a	13,00 a	15,48 c
BRS Tumucumaque	14,93 c	94,0 b	86,0	15,20 b	7,28 b	9,78 ab
CV (%)	1,61	2,46		4,77	12	9,84

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

As cultivares BRS Aracê e BRS Xique-Xique apresentaram maior índice de velocidade de germinação, 16,57 e 16,32 respectivamente (Tabela 1). O índice de velocidade de germinação é baseado no princípio de que lotes de sementes que possuem maior velocidade de germinação são mais vigorosos.

Quanto ao comprimento de raiz a cultivar BRS Tumucumaque apresentou o menor valor (7,28 cm), enquanto que Angelim e BRS Xique-Xique apresentaram os maiores valores (13 cm). Para o comprimento da parte aérea a variedade Mercado apresentou o menor valor (9,01 cm) e a BRS Xique-Xique foi a variedade mais desenvolvida (15,48 cm) (Tabela 1). Nossos resultados mostram valores superiores quando comparados com os trabalhos de Da Silva et al. (2019) que observaram o valor médio de no máximo 4,8 cm para variedades crioulas de feijão-caupi. Estes parâmetros de crescimento das plântulas refletem no seu desempenho em campo, visto que o sucesso nessa fase do desenvolvimento exprime no seu potencial produtivo.

Todas as variedades avaliadas em nossa pesquisa apresentaram vigor muito alto. Esses resultados foram parcialmente semelhantes aos estudos realizados por Da Silva et al. (2019) que em seus ensaios, apenas duas variedades de feijão-caupi apresentaram vigor muito alto, Pingo de Ouro e Sempre Verde com 92% e 86%, respectivamente. Os altos valores de vigor estão relacionados com o sucesso do estabelecimento e maior produtividade em campo (MARCOS FILHO, 2015).

Os valores do teste de emergência para as sementes de feijão-caupi entre as variedades tradicionais foi de 96% a 99%, e para as variedades biofortificadas os valores foram 86,5% a 98,5% (Tabela 2). Todas as variedades apresentaram alto valor de emergência em casa de vegetação. No teste de emergência (E) e no índice de velocidade de emergência (IVE) quanto mais rápida for a emergência das plântulas no campo, mais vigoroso será a amostra/lote de sementes (RAISSE et al., 2020).

A cultivar BRS Tumucumaque apresentou maior condutividade elétrica (CE), dentre todas as variedades, com $77,12 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$, apresentando portanto maior quantidade de lixiviados, visto que quanto maior o valor da CE maior o nível de extravasamento conteúdo celular para o processo de embebição da sementes (KRUSE et al., 2006). Esse dado comparado com o maior valor de umidade encontrado, demonstra que essa cultivar está armazenada sob umidade mais elevada e provavelmente em processo de deterioração inicial, comprometendo parte aérea e raiz, já que tais valores para Tumucumaque se apresentaram menores quando comparados com as demais cultivares e variedades. Porém, notou-se que mesmo as variedades com maiores valores de CE, não tiveram prejuízo na germinação e emergência em casa de vegetação, todas as variedades apresentaram pleno desenvolvimento.

Os valores encontrados para as variedades tradicionais não diferiram estatisticamente (Tabela 2). Valores semelhantes foram encontrados em *Phaseolus vulgaris* L. (feijão-comum)

por Michels et al. (2014) com médias entre 85,2 e 89,7 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$. No entanto, nossos valores superam em qualidade as sementes crioulas de feijão-caupi estudadas por Da Silva et al. (2019), que obtiveram resultados entre 140 e 145 $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$, esses valores representam o dobro da quantidade de lixiviados encontrados na nossa amostra de maior valor.

Tabela 2: Valores médios de Emergência (E); Índice de velocidade de emergência (IVE) e condutividade elétrica (CE) das variedades tradicionais e biofortificadas de feijão-caupi

VARIEDADES			
TRADICIONAIS	E (%)	IVE	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
Angelim	96 a	9,71 d	35,62 a
Mercado	99 a	10,59 cd	37,30 a
Manteiguinha	98,5 a	11,98 bc	37,32 a
BIOFORTIFICADAS			
BRS Aracê	98,5 a	14,67 a	49,77 b
BRS Xique-Xique	96,5 a	14,64 a	67,22 c
BRS Tumucumaque	86,5 b	12,36 b	77,12 d
CV (%)	2,69	5,95	4,39

Médias seguidas pela mesma letra minúsculas na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade

No teste de sanidade através foram identificados os fungos: *Aspergillus niger* Tiegh; *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link; *Fusarium* sp.; *Penicillium* sp.; *Phoma* sp.; *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill.; *Colletotrichum* sp.; *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid; *Rhizoctonia* sp. e *Trichoderma* sp. (Tabela 3).

Tabela 3: Incidência (INC) de fungos (%), Total de contaminantes expressos em unidade de colônias (UN) identificados em variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi

Incidência de fungos (%)	Variedades						Total da INC (%)
	Tradicionais			Biofortificadas			
	Angelim	Mercado	Mant*	BRS Aracê	BRS Xique-Xique	BRS Tumuc**	
<i>Aspergillus niger</i>	15,56	19,62	28,9	30,93	29,91	41,66	166,58
<i>Cladosporium herbarum</i>	28,74	17,08	23,12	5,03	20,51	7,14	101,62
<i>Penicillium</i> sp.	26,94	22,15	38,72	25,17	13,67	28,09	154,74
<i>Fusarium</i> sp.	18,56	37,97	4,04	33,09	33,33	-	126,99
<i>Phoma</i> sp.	2,99	-	1,73	2,15	0,88	-	7,75
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	-	2,89	2,92	-	21,19	27
<i>Macrophomina phaseolina</i>	5,98	-	0,6	-	-	-	6,58
<i>Trichoderma</i> sp.	-	-	-	0,71	-	-	0,71
<i>Levedura</i>	-	-	-	-	1,7	1,92	2,41
<i>C. gloeosporioides</i> ***	1,23	-	-	-	-	-	1,23
<i>Rhizoctonia</i> sp.	-	3,18	-	-	-	-	3,18
Total de espécies (UN)	7	5	7	7	6	5	
Total das colônias (UN)	167	158	173	139	117	420	

* Manteiguinha

** BRS Tumucumaque

*** *Colletotrichum gloeosporioides*

Os fungos que atacam as sementes podem ser divididos em fungos de campo ou de armazenamento. Os fungos de campo geralmente permanecem quiescente durante o armazenamento da semente, enquanto que os fungos de armazenamento afetam as sementes armazenadas, pois são capazes de crescer sob condições relativamente secas (GALLI et al., 2007). *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium* sp. foram encontrados nas variedades tradicionais e cultivares fortificadas com alta incidência: 166,58%, 101,62% e 154,74%, respectivamente e enquadram-se segundo BRASIL (2009b) como fungos de armazenamento. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Gomes et al. (2008), Da Silva et al. (2019); Rodrigues e Menezes (2002); Silva et al. (2016) ao avaliarem sementes de variedades de feijão-caupi observaram a predominância de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.

O fungo *Aspergillus niger* tem ocorrido em percentuais maiores que *Penicillium* sp. em outros trabalhos. Segundo Francisco e Usberti (2008) a maior incidência de *Aspergillus niger* com relação a *Penicillium* sp. ocorre porque o fungo *A. niger* é um colonizador primário, em muitos casos associado com *Penicillium* sp., o qual ocorre como colonizador secundário. Dentre os fungos de armazenamento, a menor ocorrência do gênero *Cladosporium* sp. foi observado

por Ferreira et al. (2017), esses autores relataram a maior incidência de *Aspergillus* sp. quando comparado com *Cladosporium* sp. na superfície de sementes de feijão 'Red Mexican', corroborando com os nossos resultados.

Dentre os fungos habitantes do solo que infectam o feijão-caupi, encontramos nas sementes das variedades testadas a presença de *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* agente causal da Murcha de *Fusarium*, *Macrophomina phaseolina* agente causal da podridão cinzenta do caule e *Rhizoctonia solani* agente causal da mela (Tabela 3).

O gênero *Fusarium* sp. esteve presente com alta porcentagem de incidência em grande parte das variedades, com exceção da BRS Tumucumaque. Esse gênero é responsável por causar doenças com danos significativos para cultura do feijão-caupi. O patógeno é um habitante natural do solo, sobrevive como saprófita, normalmente transmitido no interior e na superfície das sementes, de onde surgem os focos iniciais da doença em áreas cultivadas (CARDOSO, 2000).

A cultivar BRS Tumucumaque apresentou o maior número total de unidade de colônias (420) de microrganismos por total de sementes, esses dados foram obtidos através da contagem individual das colônias encontradas por unidade de sementes e somadas ao final, do total de 200 sementes. Entre todas as variedades tradicionais e cultivares biofortificadas, representando a maior incidência de *Aspergillus niger* (41,66%); *Rhizopus stolonifer* (21,19%) e de Levedura (1,92%) Tabela 3. É provável o elevado teor de água (14,93% - Tabela 2) tenha favorecido a alta incidência de contaminantes nas sementes. Segundo Mantovani et al. (2010); Carvalho e Nakagawa (2012) sementes com altos teores de umidade tornam-se muito vulneráveis a colonização por altas populações de fungos e insetos. Porém, vale ressaltar que a diversidade de espécies fúngicas encontradas em BRS Tumucumaque limita-se a cinco. Em Angelim, Manteguinha e BRS Aracê chega a sete espécies distintas, demonstrando que Tumucumaque apresentou maior incidência mas em menor variedade de fungos.

Os fungos de armazenamento, como *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., contaminam os grãos após a colheita e têm a capacidade de viver associados as sementes mesmo com teor de umidade mais baixo (13% a 13,5%). Dentre os diversos fungos que atacam os grãos armazenados, a maioria inicia o desenvolvimento quando os teores de umidade se encontram acima de 13,5% (FONTES; MANTOVANI, 1993).

CONCLUSÃO

As variedades tradicionais e biofortificadas apresentaram qualidade fisiológica e sanitária semelhantes. O teor de água presente na cultivar BRS Tumucumaque demonstra processo de deterioração inicial, comprometendo parte aérea e raiz. Além disso, é provável que o maior número de fungos contaminantes encontrados nessa variedade, esteja relacionado ao elevado teor de água presente nas sementes. As cultivares biofortificadas podem ser indicadas para plantio em substituição as variedades tradicionais, visto que esta podem oportunizar o consumo de mais nutrientes por parte da população considerando os maiores teores de ferro, zinco e proteínas existentes nos grãos biofortificados.

REFERÊNCIAS

ABRASEM – ASSOCIAÇÃO NACIONAL DE SEMENTES E MUDAS. **Anuário 2017**. Brasília, DF: ABRASEM, 2016. Disponível em: <http://www.abrasem.com.br/anuarios/>. Acesso em: 7 nov. 2022.

ASSIS, M. O. et al. Pre-harvest desiccation in productivity and physiological quality of Cowpea seeds. **Planta daninha**, 37: 1-11, 2019.

ATHAYDE SOBRINHO, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil. In: BASTOS, E. A. (Coord.). **A Cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte; Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Divisão de Análise de Risco de Pragas, 2016. cap. 3. p. 44-67.

BARROCAS, E.; MACHADO, J. C. **Introdução a patologia de sementes e testes convencionais de sanidade de sementes para detecção de fungos fitopatogênicos**. Informativos ABRATES. Londrina. vol. 20, n. 3, 2010.

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi* (3^a ed). Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1998.

BRAGANTINI, C. **Alguns aspectos do armazenamento de sementes e grãos de feijão**. 2005. 1. ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2005. 28p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Vegetal. **Manual de análise sanitária de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009a. 200p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009b. 395p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 45, de 17 de setembro de 2013. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, n. 183, 20 set. 2013. Seção 1, p. 6-27.

CARDOSO, M.J. (Org.). **A cultura do feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil**. 1. Ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, Circular Técnica, 28, 2000. 264 p.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 5.ed. FUNEP: Jaboticabal, 2012. 590p.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v.8– Safra 2020/21, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, 2021. 85 p.

DA SILVA, R. T. et al. Physiological and Sanitary Quality in Cowpea Seeds Produced in Rio Grande Do Norte, Brazil. **Journal of Agricultural Science**; 11, n. 3, 2019.

DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. **InfoStat versión 2018**. Centro de Transferencia InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

ELLIS, M. B., 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey England: 1971. 608 p.

FERREIRA, D.S. et al. Ocorrência de fungos em sementes de feijão “Red Mexican” e seu efeito na germinação. **Scientia Agraria Paranaensis**, Acrelândia, 16: .542 - 545, 2017.

FONTES, R. de A.; MANTOVANI, B. H. M. Armazenamento das sementes. In: **Tecnologia para produção de sementes de milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1993. p. 49-54.

FRANCISCO, F.G.; USBERTI, R. Seed health of common bean stored at constant moisture and temperature. **Scientia Agricola**, Piracicaba, 65: 613-619, 2008.

GALLI, A; PANIZI, R.C.; VIEIRA, R.D. Sobrevivência de patógenos associados a sementes de soja armazenadas durante seis meses. **Brazilian Seed Journal**, 29: 205-213, 2007.

GOMES FILHO, J. E. et al. Qualidade fisiológica de sementes de feijão-caupi cultivadas no semiárido mineiro. **Revista Agrotecnologia**, 8: 19- 27, 2017.

GOMES, D. P. et al. Qualidade fisiológica e incidência de fungos em sementes de feijão caupi produzidas do Estado do Ceará. **Revista Caatinga**, 21: 165-171. 2008.

GONÇALVES A.S.F. et al. Uso da biofortificação vegetal: uma revisão. **Cerrado Agrociências**; 6:75-87. 2015.

KRUSE, N. D. et al. Estresse oxidativo em girassol (*Helianthus annuus*) indica sinergismo para a mistura dos herbicidas metribuzin e clomazone. **Planta Daninha**, 24: 379-390, 2006.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. The Fusarium laboratory manual. Ames: Blackwell, 2006, 388 p.

- MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2: 176-177, 1962.
- MANTOVANI, E. C. Colheita e pós-colheita: colheita. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 1. ed. Piracicaba: FEALQ, 2015. 495p.
- MICHELS, A. F. et al. Qualidade fisiológica de sementes de feijão crioulo produzidas no oeste e planalto catarinense. **Revista Ciência Agronômica**, 45: 620-632. 2014.
- MUNIZZI, A. et al. Qualidade de sementes de quatro cultivares de soja, colhidas em dois locais no estado de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Sementes**, 32: 176-185, 2010.
- RAISSE, E. R. et al. Chemical desiccants for anticipation of harvest and physiological quality of cowpea seeds. **Revista Caatinga**, 33: 878-887, 2020.
- RODRIGUES, A. A. C; MENEZES, M. Detecção de fungos endofíticos em sementes de caupi provenientes de Serra Talhada e de Caruaru, Estado de Pernambuco. **Fitopatologia Brasileira**, 27: 532-537, 2002.
- ROCHA, M. MOURA. et al. **Biofortificação do feijão-caupi**. 1 ed. Brasília, DF. Embrapa. 2014. 26 p.
- SILVA, A. C. **Características agronômicas e qualidade de sementes De feijão-caupi em Vitória da Conquista, Bahia**. 2011. 87f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.
- SILVA, F. H. A. et al. Qualidade sanitária de sementes salvas de feijão-caupi utilizadas pelos agricultores do Rio Grande Norte. **Revista de Ciências Agrárias**, 59: 60-65. 2016.
- SILVA, G. C. **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. 2006. 105f. Dissertação (Mestrado em Agroecologia) Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2006.
- SILVA, T. C.; SCALON, S. P. Q.; FREITAS, H. M. D.; COSTA, C. Germination and seedling vigor of soybean seeds as a function of moisture contend and storage time. **Journal of Seed Science**, 43, n. 3, 2021.
- VIEIRA, R. D., CARVALHO, M. N. **Testes de vigor em sementes**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1994. 164p.



CAPÍTULO III

CAPÍTULO III - *Bacillus methylotrophicus* como biocontrole associado a *Bradyrhizobium* sp. para promoção de crescimento e reação de variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi à Murcha de Fusarium

Artigo escrito de acordo com as normas da revista “Biological Control”

Bacillus methylotrophicus* como biocontrole associado a *Bradyrhizobium* sp. para promoção de crescimento e reação de variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi à Murcha de *Fusarium

Larisse Raquel Carvalho Dias

Eliza Gonçalves de Sousa

Luis Manuel Hernández García

Leonardo de Jesus Machado Gois de Oliveira

Erlen Keila Candido e Silva

Ruan Ithalo Ferreira Santos Cavalcante

Antonia Alice Costa Rodrigues

RESUMO

O cultivo do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] está em expansão no Brasil e possui elevada importância socioeconômica. No entanto, um dos fatores limitantes a cultura é o acometimento por vários fitopatógenos, dentre eles destaca-se *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, que afetam a produtividade e causa a morte das plantas. São escassas as informações acerca de microrganismos com potencial para biocontrole da Murcha de *Fusarium* e para a melhoria da produtividade em variedades de feijão-caupi. Desse modo, nosso objetivo foi avaliar o biocontrole de *Bacillus methylotrophicus* sobre *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, a reação e o potencial de *Bradyrhizobium* sp. na promoção de crescimento das variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi à Murcha de *Fusarium*. O antagonismo *in vitro* de *B. methylotrophicus* ao *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foi avaliado pelo método do pareamento em círculo. Em casa-de-vegetação, sementes de duas variedades tradicionais e três cultivares biofortificadas foram microbiolizadas com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp., inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* e avaliadas quanto ao biocontrole e reação à Murcha de *Fusarium*. Para verificar o efeito promotor de crescimento foram avaliados: altura de planta; número de folhas; comprimento da raiz; número de nódulos; massa fresca e massa seca da parte aérea. Nos testes *in vitro*, *B. methylotrophicus* foi eficiente em inibir o crescimento micelial de diferentes isolados de *F. oxysporum* em até 66,55%. O percentual de biocontrole foi mais eficiente nas plantas quando coinoculadas com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. apenas para a variedade Angelim (33%). A variedade Manteguinha (16,67%) e as cultivares Tumucumaque (25%) e Xique-Xique (50%) responderam melhor ao tratamento apenas com *B. methylotrophicus*. Não houve mudança na incidência da Murcha de *Fusarium* e nem modificação da reação nas variedades tradicionais e biofortificadas avaliadas quando tratadas apenas com *Bradyrhizobium* sp. A microbiolização de sementes com *Bradyrhizobium* sp. proporcionou aumento da altura das plantas, número de folhas, comprimento da raiz e número de nódulos para Angelim e Tumucumaque. Estes estudos indicam o potencial biocontrolador de *B. methylotrophicus* e efeito promotor de crescimento de *Bradyrhizobium* sp. constituindo-se uma alternativa viável e sustentável para o manejo fitossanitário da Murcha de *Fusarium* em feijão-caupi.

Palavras chaves: *Vigna unguiculata*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, Controle biológico

INTRODUÇÃO

O cultivo do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] é crescente no Brasil, e a maior parte da produção está concentrada nas regiões Norte e Nordeste. A importância socioeconômica dessa cultura, principalmente para os agricultores familiares, ocorre devido ao seu alto valor nutricional encontrado nas proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras (FREIRE FILHO et al., 2011).

No Maranhão, o feijão-caupi tem notoriedade, principalmente por apresentar alta demanda consumidora, segundo dados do boletim de novembro de 2021 da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), a colheita foi finalizada nos 18,1 mil hectares plantados com o feijão-caupi na primeira safra. A produção ficou em 9,4 mil toneladas, sendo 4,3% inferior ao volume colhido em 2020/2021, considerada baixa, com uma produtividade média de 495 kg/ha, mesmo assim, a cultura continua sendo fundamental para a cadeia produtiva (CONAB, 2022).

Em relação ao aspecto fitossanitário da cultura, as doenças fúngicas têm maior impacto nas lavouras de feijão-caupi, e essa condição persiste desde o cultivo no campo até o armazenamento. Destacam-se as doenças que afetam o estágio vegetativo, incluindo diversos órgãos da planta. Dentre as doenças que atacam a cultura, a Murcha de *Fusarium* está entre as mais importantes causada pelo fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (E.F. Smith) W.C. Snyder & H.N. Hansen (PIO-RIBEIRO; ASSIS FILHO, 1997). A doença ocorre em grande parte das áreas onde a espécie é cultivada, se tornando cada vez mais notável para a cultura, justificando o desenvolvimento de trabalhos visando sua resistência (FERREIRA et al., 2020).

O uso de inoculantes composto por bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem se mostrado uma estratégia para o aumento da produtividade do feijão-caupi, onde estirpes de *Bradyrhizobium* sp. são atualmente recomendadas para esta cultura (SOUZA et al. 2021). Essas bactérias são capazes de estimular diversos processos fisiológicos que favorecem o funcionamento do organismo vegetal (HUNGRIA, 2011).

Outro gênero de bactérias com potencial para uso agrícola são as do gênero *Bacillus*, várias espécies desse gênero se destacam pela ampla capacidade de produção de moléculas ativas biologicamente, com lipopeptídeos, quitinases e glucanases, que apresentam diversos mecanismos antagônicos, essa capacidade é explorada para a proteção de plantas contra doenças fúngicas (AGARWAL et al. 2017). Além disso, essas rizobactérias podem produzir fitormônios, secretar sideróforos, quelantes de ferro e solubilizar sais fosfáticos, esses

compostos melhoram a qualidade do solo e conseqüentemente podem promover o crescimento e a sanidade vegetal (SHARMA et al. 2018). Nesse sentido Gu et al., (2017) purificaram lipopeptídeos cíclicos e Yadav et al., (2021) identificaram iturina, fengicina, surfactina e bacilomicina de *Bacillus* spp. e verificaram sua atividade antifúngica contra o fungo patogênico *Fusarium oxysporum*.

Diante do exposto o objetivo desse trabalho foi avaliar o biocontrole de *B. methylotrophicus* sobre *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, a reação e o potencial de *Bradyrhizobium* sp. na promoção de crescimento das variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi à Murcha de *Fusarium* em condições de laboratório e em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia e na casa de vegetação da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus Paulo VI, São Luís, coordenadas 2° 59'19" S, 44° 21'20" W.

Avaliação antagônica de *B. methylotrophicus* para o controle de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *in vitro* pelo método do pareamento em círculo.

Para o estudo do efeito antagonista de *B. methylotrophicus* sobre *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foram utilizados isolados de *B. methylotrophicus* (MGSS 276) e quatro isolados de *Fusarium* (MGSS 60, MGSS 395, MGSS 396 e MGSS 397) obtidos da coleção de microrganismos da Micoteca “Prof. Gilson Soares da Silva” (MGSS) - UEMA. Foi realizado um experimento *in vitro*, pelo método de pareamento em círculo. Inicialmente, o isolado de *B. methylotrophicus* foi cultivado por 48 h e quatro isolados do fitopatógeno por sete dias em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar), após este período de cultivo foram transferidos assepticamente para o centro da placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA, um disco de 6,0 mm de diâmetro do fitopatógeno. Em seguida, com auxílio de uma alça de platina, foram repicadas a cultura bacteriana, na mesma placa, distribuída no formato de círculo com diâmetro aproximado de 50 mm. Para os tratamentos controles os isolados do fitopatógeno foram cultivado somente em meio BDA (MARIANO; ASSIS, 2005).

Foi avaliado a inibição do crescimento micelial através de medições do diâmetro das colônias de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada, durante dez dias. O delineamento experimental adotado foi

inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e seis repetições, compostos por quatro isolados e seus tratamentos controle.

A porcentagem de inibição do crescimento micelial foi calculada pela fórmula de (P.I.C) (MENTEN et al., 1976), onde:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

Biocontrole da Murcha de *Fusarium* com *B. methylotrophicus* e reação de resistência de plantas de feijão-caupi tradicionais e biofortificadas, acrescidas ou não com *Bradyrhizobium* sp. em casa de vegetação

Para o experimento com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* foram utilizadas sementes de duas variedades tradicionais (Angelim e Manteiguinha) e três cultivares biofortificadas (BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique).

As sementes foram microbiolizadas com a estirpe comercial de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6462, autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso na cultura do feijão-caupi. O inoculante comercial mantido a 24 °C, foi agitado por um minuto a 150 rpm, e em seguida aplicado nas sementes na quantidade recomendada pelo fabricante de 150 ml/ 50 kg, sendo agitadas por um minuto a 150 rpm para melhor distribuição do produto. Além disso, a viabilidade do lote comercial de *Bradyrhizobium* sp. foi avaliada antes do processo microbiolização das sementes, a partir do microcultivo pelo método de risca dessas bactérias em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e análise do crescimento *in vitro* após 24 h, segundo a metodologia descrita por Mariano e Assis, (2005).

Para a microbiolização das sementes com *B. methylotrophicus* foi utilizado o isolado bacteriano MGSS 276, esta foi previamente multiplicada em meio de cultura BDA e mantida em câmara tipo BOD para crescimento por 48h a 28 °C e fotoperíodo de 12h. Em seguida, foi preparada a suspensão bacteriana diluída em Cloreto de Sódio a 0,85% e concentração ajustada para 10⁸ UFC ml⁻¹, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm e absorvância de 0,5. As sementes das variedades de feijão-caupi foram imersas, por um minuto sob agitação constante a 150 rpm, em suspensão preparada com a bactéria. No processo de coinoculação, as sementes foram microbiolizadas com *Bradyrhizobium* sp., e em seguida com a bactéria *B. methylotrophicus*.

Após a realização das microbiolizações, as sementes foram semeadas em vasos de capacidade de 3 kg, contendo solo e esterco bovino autoclavado na proporção 3:1, após 15 dias foi feito o desbaste deixando-se três plantas por vaso. A inoculação do patógeno ocorreu aos 30 dias após a semeadura, realizada por ferimento no sistema radicular, pela abertura de um sulco em “meia lua” ao redor do colo da planta, onde foi depositada a suspensão no volume de 20 mL por planta, mantidas durante 48 h em câmara úmida.

Para o preparo do inóculo, o isolado de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (MGSS 60) foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, mantidas em BOD durante sete dias a 25 ± 2 °C, sob o regime de alternância luminosa (12h claro/12h escuro). As suspensões de esporos foram ajustadas para a concentração para 1×10^6 conídios mL⁻¹ com auxílio da câmara de Neubauer, através da adição de água destilada nas placas e raspagem do crescimento micelial.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial, onde para a avaliação do ensaios de biocontrole foram utilizados cinco variedades (Angelim, Manteiguinha, BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique) e 4 tipos de tratamentos das sementes (Controle, *B. methylotrophicus*, *Bradyrhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. + *B. methylotrophicus*) perfazendo um total de 20 tratamentos com 4 repetições cada, sendo a unidade experimental um vaso contendo três plantas. A avaliação da reação das variedades ao patógeno foi realizada nas cinco variedades microbiolizadas e não microbiolizadas com *Bradyrhizobium* sp., totalizando 10 tratamentos.

Os sintomas da doença foram avaliados aos 21 dias após a inoculação das plantas, utilizando-se uma escala que variou de 0 a 4 de acordo com os níveis de severidade, onde 0 = ausência de sintomas; 1 = ausência de sintomas externos de murcha e presença de escurecimento vascular confinada à raiz principal; 2 = sintomas iniciais da doença (amarelecimento e murcha) e escurecimento vascular atingindo o terço inferior do caule; 3 = sintomas bem definidos da doença (amarelecimento, murcha, lesões foliares e seca de folhas) e escurecimento vascular atingindo o terço médio da planta; e 4 = sintomas bem definidos da doença e escurecimento vascular atingindo o terço superior da planta ou plantas mortas (SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987).

A partir dos dados obtidos com a escala de notas, foram calculados os índices de severidade da doença (SVD) pela equação 1, descrita por McKinney (1923).

$$SVD = [(N1)+(N2 \times 2)+(N3 \times 3)+(N4 \times 4)/(N0+N1+N2+N3+N4) \times k] \times 100$$

Em que: N0 é o número de plantas com doença na categoria 0, N1 é o número de plantas com doença na categoria 1, N2 é o número de plantas com doença na categoria 2, N3 é o número de plantas com doença na categoria 3, N4 é o número de plantas com doença na categoria 4 e k é o número de categorias.

A avaliação do índice da doença foi realizada usando a seguinte escala de reação das cultivares ao patógeno, sendo: 0% = imunidade, 1-10% = altamente resistente, 11-20% = moderadamente resistente, 21-40% = moderadamente susceptível, 41- 60% = susceptível, 70% = altamente susceptível (FAWOLE, 1989). O resultado para incidência da doença foi obtido a partir do total de plantas doentes dividido pelo total de plantas e multiplicado por 100.

Ao final dos experimentos foi avaliado ainda o efeito na promoção de crescimento das plantas das cinco variedades nos seguintes tratamentos: Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (PBFBN), perfazendo um total de 40 tratamentos.

Na promoção de crescimento, as plantas foram coletadas e avaliados os seguintes parâmetros: a) altura de planta, expressa em cm, medida com régua milimetrada, a partir do coleto até a gema apical; b) número de folhas; c) comprimento da raiz, expresso em cm, medida com régua milimetrada, a partir do coleto até a extremidade da maior raiz; d) número de nódulos; e) massa fresca e massa seca da parte aérea, expressa em grama, pesada em balança com precisão de 0,001g; para determinação da massa seca, o material vegetal foi conduzido à estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65°C por 72h.

3.5 Análises estatísticas

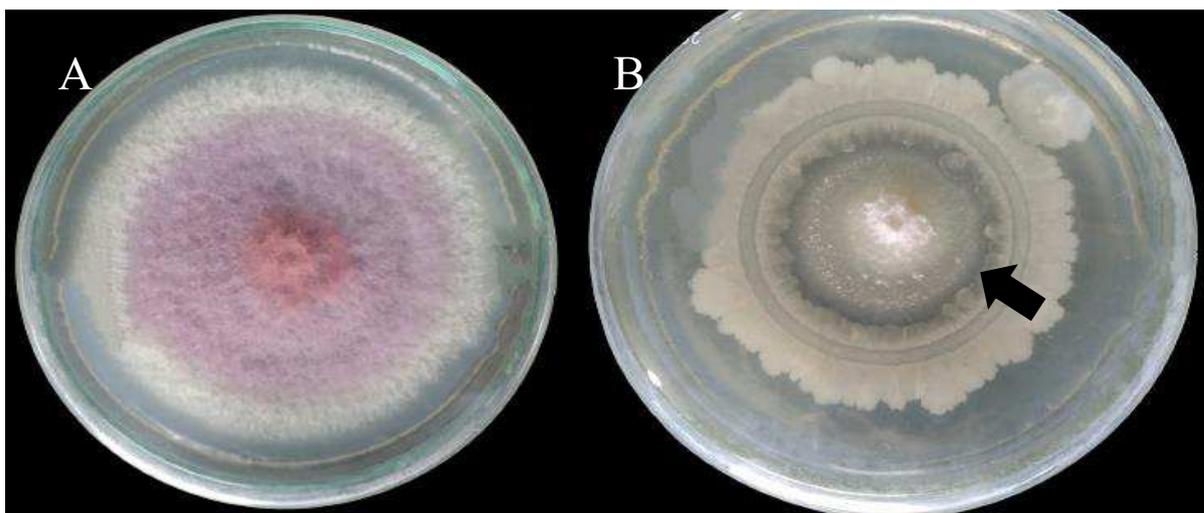
Os dados de biocontrole e reação, foram submetidos a análise de variância e as médias foram comparadas usando o teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o software R. As médias dos parâmetros de crescimento foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas (Dunnets) e todas as análises foram realizadas utilizando o software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste *in vitro*, foi observado um halo formado pelo crescimento bacteriano ao redor da colônia do patógeno, inibindo o crescimento deste, evidenciando que mesmo quando o patógeno conseguiu desenvolver a colônia, esta se apresentou com crescimento micelial falho

e sem volume, imerso no meio de cultura, perdendo a característica de micélio aéreo e cottonoso, além de mudança na coloração típica da colônia do *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (Figura 1).

Figura 1 Efeito antagônico de *Bacillus methylotrophicus* (MGS 276) contra *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em meio de cultura BDA (A) Controle (B) Avaliação do antagonismo *in vitro* pelo método do pareamento em círculo. Halo de inibição (Seta).



Essa bactéria foi significativamente ($p < 0,05$) eficiente em inibir o crescimento micelial de diferentes isolados de *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em 46,55%; 52,32%; 66,55% e 55,99% para os isolados MGSS 60; MGSS 395; MGSS 396 e MGSS 397 respectivamente, impedindo-os de crescer mais de 3,5 cm de diâmetro, comparável ao controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Percentagem de inibição do crescimento micelial (cm) de isolados do fungo *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* pelo isolado bacteriano de *B. methylotrophicus* (MGSS 276) após sete dias de avaliação.

Isolados fúngicos	<i>B. methylotrophicus</i> Taxa de inibição (%)
MGSS 60	46,55±16,27 ^a
MGSS 395	52,32±20,72 ^a
MGSS 396	66,55±5,95 ^a
MGSS 397	55,99±17,23 ^a

Mesmas letras na coluna são significativamente iguais ($p \leq 0,05$), Valores (em cm) são as médias \pm EP (n = 3).

Gu et al., (2017) ao verificarem o biocontrole de *Bacillus* sp. sobre espécies de *Fusarium* relacionaram esse potencial inibitório ao Bacilomicina-D, um lipopeptídeo que foi capaz de

causar morte celular e degradar o micélio do patógeno, inibindo tanto seu potencial vegetativo quanto reprodutivo.

Yadav et al., (2021) observaram alta porcentagem de inibição (77,59%) *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 causada por *Bacillus licheniformis*, e identificaram os metabólitos antifúngicos: iturina, fengicina, surfactina e bacilomicina como responsáveis pelo efeito biocontrolador.

Biocontrole da Murcha de *Fusarium* utilizando *B. methylophilus* e reação em variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi, acrescidas ou não com *Bradyrhizobium* sp. em casa de vegetação

Para os resultados de biocontrole, houve redução da severidade somente na cultivar BRS Xique-Xique, que diferiu estatisticamente do tratamento controle quando microbiolizada apenas com *B. methylophilus*. Houve interação significativa entre os tratamentos dentro da cultivar apenas para BRS Xique-Xique, nas demais cultivares e variedades temos interação significativa apenas para o tratamento avaliado de forma isolada. Podemos observar que o percentual de controle foi maior nas plantas quando coinoculadas com *B. methylophilus* e *Bradyrhizobium* sp. apenas para as variedades Angelim e BRS Aracê. Porém, a BRS Aracê não apresentou severidade para a doença no tratamento controle, o que indica que esta variedade possuiu resistência a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* nessas condições experimentais, esses resultados se mantiveram para BRS Aracê quando coinoculadas com as duas bactérias e também quando microbiolizada apenas com *Bradyrhizobium* sp. (Tabela 1), demonstrando que esses tratamentos não interferiram na resistência desta variedade.

Manteguinha, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique responderam melhor ao tratamento em que houve inoculação apenas com *B. methylophilus* apresentando o percentual de controle de 16,67%, 25% e 50%, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 2 Severidade e controle de variedades e cultivares de feijão-caupi microbiolizadas com *Bacillus methylotrophicus* e inoculadas com *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, acrescidas ou não de *Bradyrhizobium* sp.

	Controle	<i>B. methylotrophicus</i>	<i>B. methylotrophicus</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp.		<i>Bradyrhizobium</i> sp.		
	Severidade	Severidade	Controle (%)	Severidade	Controle (%)	Severidade	Controle (%)
Angelim	2,41 aA	1,58 abA	16,67	1,41 bA	33	2,17 aA	0
Manteiguinha	2,00 aA	2,08 aA	16,67	3,08 aA	0	2,25 aA	8,34
BRS Aracê	0,00 bA	0,30 cA	91,67	0,00 cA	0	0,00 bA	0
BRS Tumucumaque	2,67 aA	2,00 abA	25	1,92 abA	16	2,16 aA	0
BRS Xique-Xique	2,75 aA	0,75 bcC	50	1,25 bcBC	33	2,25 aAB	16,67
CV (%)							27,51

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam diferença estatística entre as variedades e cultivares e maiúsculas diferenças na média da severidade causada pelos tratamentos dentro da cada variedade e cultivar.

Nossos resultados corroboram com Campos Neto et al. (2018) que observaram uma redução de mais de 70% da Murcha de *Fusarium* em plantas de tomate quando microbiolizadas com *B. methylotrophicus* em casa-de-vegetação.

Bojórquez-Armenta et al. (2021), ao avaliar o efeito antagonista de isolados de *Bacillus* spp. relataram uma diminuição da gravidade da podridão cinzenta, correlacionando o potencial antagonico da bactéria a sua capacidade de produção de compostos voláteis antagonistas. Esses resultados justificam a diminuição da severidade e aumento do percentual de controle nas cultivares em que houve aplicação apenas de *B. methylotrophicus* uma vez que não houve redução dessas variáveis nos tratamentos em que foram utilizados apenas *Bradyrhizobium* sp.

Espécies de rizobactérias do gênero *Bacillus* como vivem dentro das raízes ou em regiões próximas a elas, podem reduzir a severidade de fungos por vários mecanismos de ação direta, tanto pela competição com os fitopatógenos de solo por nutrientes (CHOWDHURY et al., 2013) como através da síntese de metabólitos antifúngicos (JEYAKUMAR; ZHANG, 2022). Gu et al. (2017) avaliaram cepas mutantes de *Bacillus* sp. que não produziam Bacilomicina-D, fengicina e surfactina e observaram que não houve atividade antifúngica provocada por esta cepa. A Bacilomicina-D e a fengicina possuem capacidade de romper a membrana plasmática do fungo o que gera consequentemente, extravasamento citoplasmático e plasmólise. A surfactina causa lise das membranas lipídicas. Esses metabólitos agem através da lise celular e consequentemente causam morte celular. Além das hifas, os conídios também são afetados por esses metabólitos, esses autores observaram inibição da germinação dos conídios e uma redução nos sintomas da Murcha de *Fusarium* em plantas de milho (*Zea mays* L.), quando em contato com os metabólitos.

Segundo a reação para Murcha de *Fusarium* observamos que não houve mudança na incidência da doença e nem modificação da reação, para as variedades tradicionais e cultivares biofortificadas quando comparadas com as plantas que não foram microbiolizadas com *Bradyrhizobium* sp., exceto para a cultivar BRS Aracê, que passou de altamente resistente para imune (Tabela 2).

Tabela 3 Reação de variedades e cultivares de feijão-caupi a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* sem e com microbiolização de *Bradyrhizobium* sp., Incidência da doença (INC); Médias de notas (Médias); Índice de severidade da doença (SVD).

Sem microbiolização				
	INC (%)	Médias	SVD (%)	Reação
Angelim	100	2,41 a	60,41	Suscetível
Manteiguinha	91,66	2,00 a	50	Suscetível
BRS Aracê	16,66	0,00 b	4,16	Altamente resistente
BRS Tumucumaque	100	2,67 a	66,6	Suscetível
BRS Xique-Xique	75	2,75 a	68,75	Suscetível
Total		1,96 ns		
Com microbiolização de <i>Bradyrhizobium</i> sp.				
Angelim	100	2,17 a	54,16	Suscetível
Manteiguinha	91,66	2,25 a	56,25	Suscetível
BRS Aracê	0	0,00 b	0	Imune
BRS Tumucumaque	100	2,16 a	52,08	Suscetível
BRS Xique-Xique	83,33	2,25 a	56,25	Suscetível
Total		1,76 ns		
CV %				27,51

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. n.s. = não significativo *P <0,05).

As pesquisas que envolvem o uso de *Bradyrhizobium* sp. são direcionadas a promoção de crescimento e melhoria da produção (GUALTER et al. 2011; DE ARAÚJO et al. 2012; ROCHA et al., 2020). Estudos do efeito da interação (rizobacteria e cultura) sobre os aspectos fitossanitários são inexistentes até o momento.

Nos resultados de incidência e severidade a BRS Aracê se mostrou resistente à Murcha de *Fusarium*. O que indica seu potencial para plantio em áreas com histórico de incidência da doença e sua qualificação para uso em programas de melhoramento visando resistência. As variedades tradicionais Angelim e Manteguinha, e as cultivares biofotificadas BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique apresentaram suscetibilidade ao patógeno mesmo após a microbiolização com *Bradyrhizobium* sp.

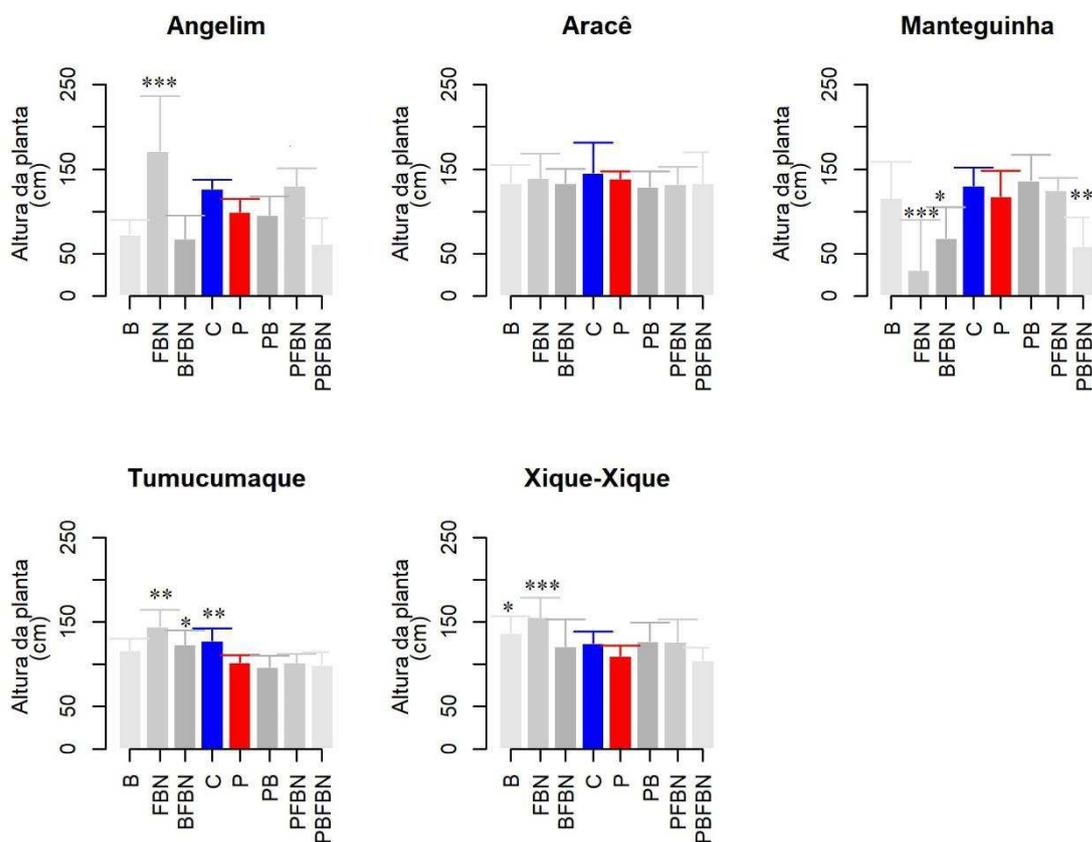
Diante da importância da Murcha de *Fusarium* na cultura do feijão-caupi, várias pesquisas foram realizadas, no intuito de detectar variedades com resistência. Rodrigues et al. (2006) comprovaram a capacidade de indutores abióticos em reduzir a severidade da Murcha de *Fusarium* nas cultivares BR-17 Gurguéia e IPA-206, em 68,90% e 71,59%, respectivamente. A cultivar BR-17 Gurguéia é reconhecidamente suscetível a essa doença, já a MNCO1-649F-2-1 foi apresentada como cultivar resistente (NORONHA et al., 2013; SILVA et al., 2021). Além disso, Noronha et al., (2013) classificou a reação de BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* como altamente suscetível em seus ensaios, corroborando com nossos resultados.

Recentemente, Silva et al., (2021) identificaram resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* nos genótipos de feijão-caupi: Canapu PE, Miranda IPA 207, Esperança e BRS Pujante. Além disso, a busca por variedades resistentes são estendidas as variedades tradicionais, por exemplo nas pesquisas feitas por Araújo (2017), que identificou 8 variedades tradicionais de feijão-caupi, encontradas principalmente no estado do Ceará, resistentes à *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (40 dias, Concebida, Azulão, Engana mulher, Santo Inácio, Feijão-da-Bahia, Pitiúba, Feijão-de-arrancada) esses resultados fortalecem o potencial de variedades tradicionais como fontes de resistência nos programas de melhoramento. Na China, Dong et al. (2022) identificaram 30 genes responsáveis pela resistência à *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em acessos de feijão-caupi, esses resultados fortalecem o melhoramento genético visando resistência de cultivares de feijão-caupi.

Parâmetros de crescimento das variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi tratadas com *B. methylotrophicus*, acrescidas ou não com *Bradyrhizobium* sp. e inoculadas com *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em casa de vegetação

As variedades Angelim, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique apresentaram a maior altura quando tratadas com *Bradyrhizobium* sp. (Figura 3).

Figura 3: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) na altura das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.

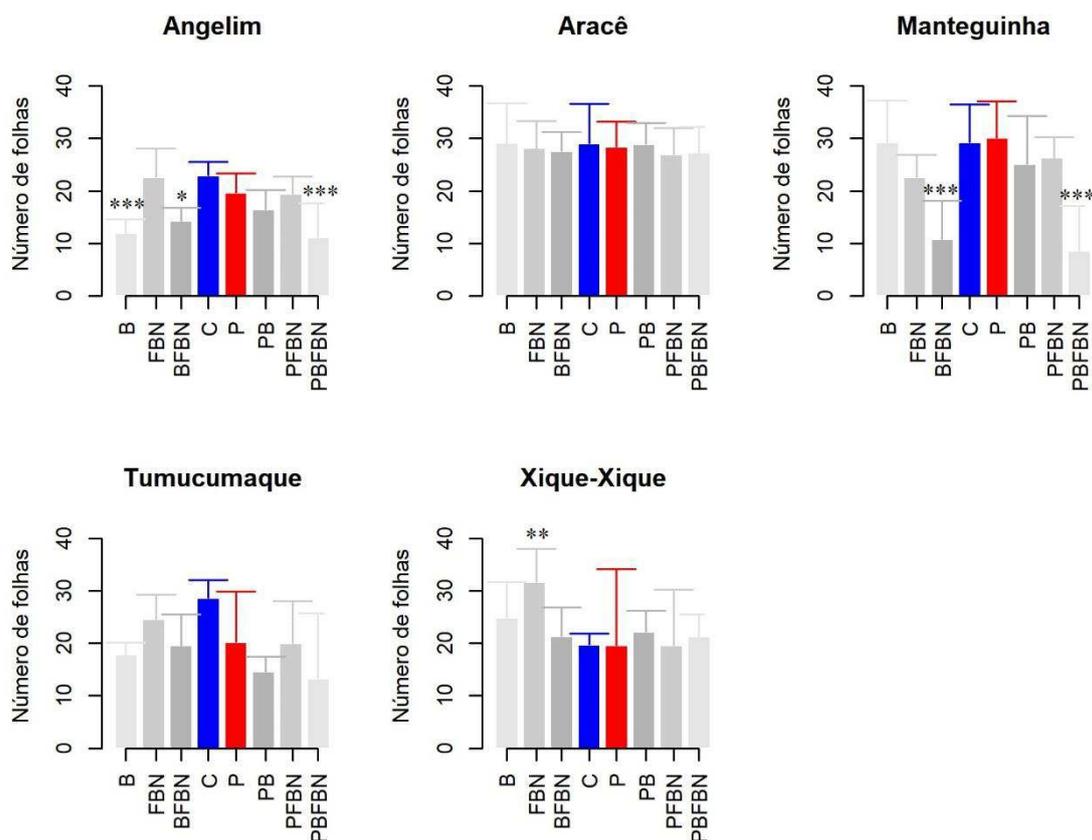


0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Esses resultados discordam de Lima et al., (2011) que não encontraram diferenças estatísticas para a altura das plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bacillus* sp. e *Bradyrhizobium* sp. e de Pereira et al., (2008) que observaram maior altura nas plantas de feijão-caupi que foram coinoculadas.

Para o número de folhas na cultivar BRS Xique-Xique ocorreu uma melhor resposta quando foi tratada com *Bradyrhizobium* sp., com resultado significativo e valores superiores aos do tratamento controle. Para Angelim, Manteguinha e BRS Tumucumaque observou-se que o menor índice para esse parâmetro ocorreu no tratamento em que houve interações entre *Bradyrhizobium* sp.; *B. methylotrophicus* e *Fusarium oxysporum* (PBFBN) Figura 4. Apesar da desfolha ser um dos principais sintomas da Murcha de *Fusarium*, nossos resultados indicaram que a queda do número de folhas nessas variedades se deve a interação das variáveis (Patógeno; *B. methylotrophicus*; *Bradyrhizobium* sp.) já que os resultados expressos pelo tratamento que recebeu apenas inoculação do patógeno não percebemos a desfolha tão pronunciada quando para o tratamento em que os três fatores interagiram.

Figura 4: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) no número de folhas das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.

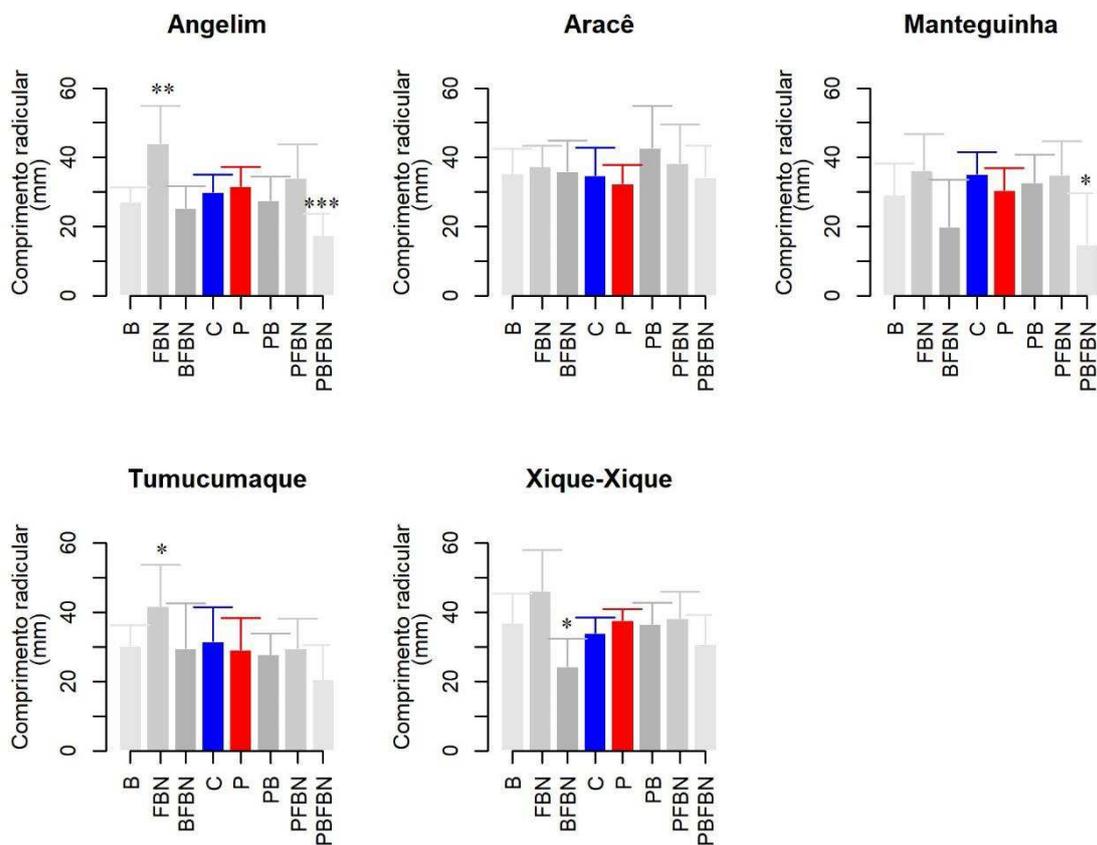


0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Nossos resultados corroboram com Bastos et al., (2012) para a variável altura de planta em BRS Aracê e para o número de folhas em BRS Aracê e BRS Tumucumaque, esses autores observaram que não houve interação significativa para tais variáveis em estudos envolvendo a BRS Aracê e sementes tratadas com *Bradyrhizobium* sp.

As variedades Angelim, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique obtiveram maior desenvolvimento da raiz devido ao tratamento com *Bradyrhizobium* sp. (Figura 5).

Figura 5: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) no comprimento da raiz das cultivares tradicionais e biofortificadas.

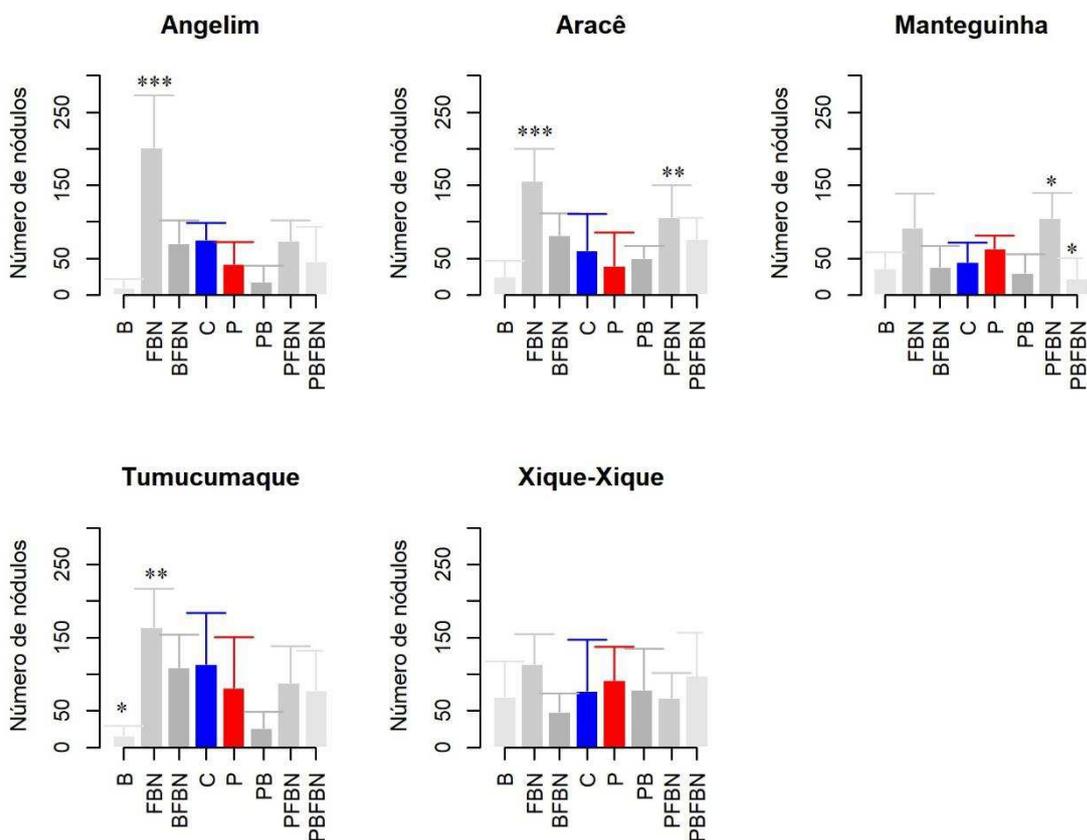


0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Quanto ao comprimento da raiz, nossos resultados para a cultivar BRS Aracê concordam com os resultados de Lima et al., (2011) onde não obtiveram diferença significativa entre os tratamentos em sementes de feijão-caupi tratadas com *Bacillus* sp. e *Bradyrhizobium* sp.

Todas as cultivares tratadas com *Bradyrhizobium* sp. tiveram um aumento significativo no número de nódulos quando comparados aos tratamentos que não receberam essa bactéria. A variedade Angelim obteve números superiores em relação às demais cultivares (Figura 6).

Figura 6: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) no número de nódulos de cultivares tradicionais e biofortificadas.



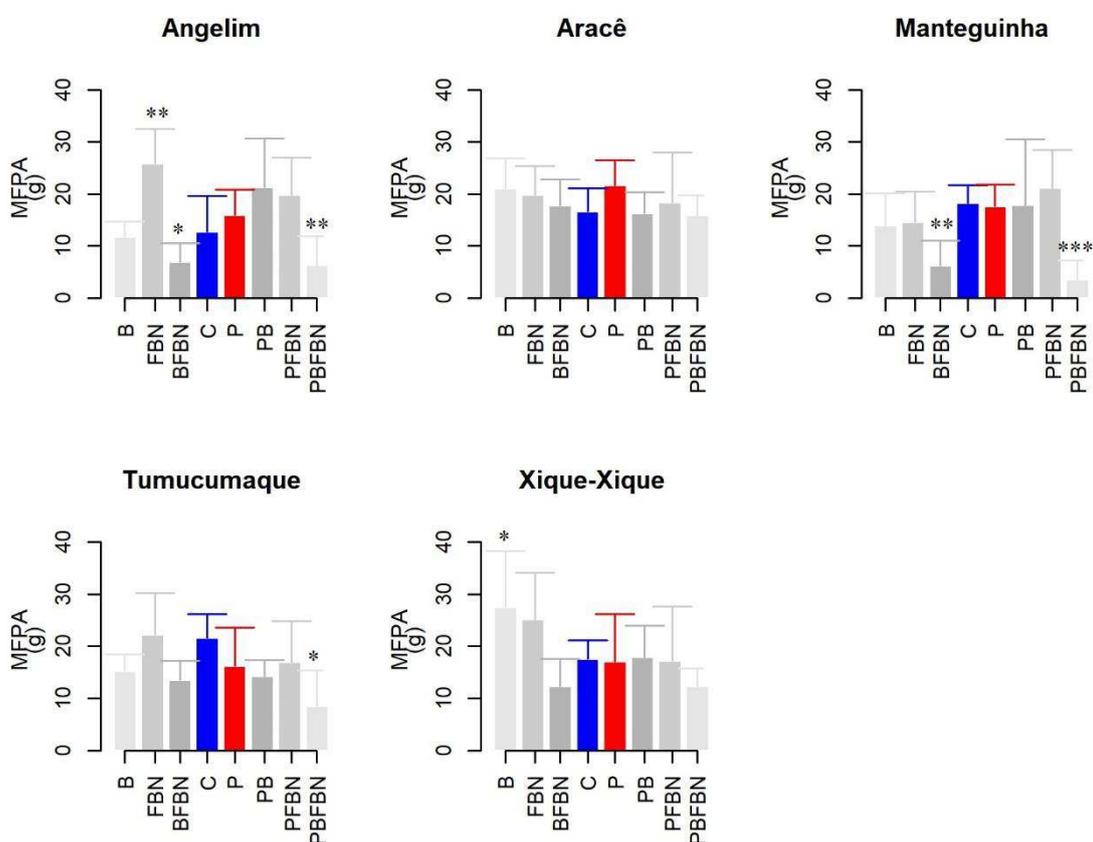
0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

O aumento dessa variável corroborou com os resultados encontrados por De Araújo et al., (2012), que avaliaram a nodulação em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Bradyrhizobium* sp., esses autores evidenciaram que, apesar de também terem avaliado a coinoculação das bactérias *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium* sp. os tratamentos que receberam apenas *Bradyrhizobium* sp. revelaram valores mais elevados desta variável. Corroboramos com Souza et al., (2021) que observaram altos valores de nodulação em plantas de feijão-caupi, para as variedades IPA-206, BR 17 Gurguéia e BRS Novaera quando as sementes foram tratadas com *Bradyrhizobium* sp. e comparadas com os tratamentos não inoculados. Gualter et al., (2011) avaliaram estirpes de *Bradyrhizobium* sp. sobre a nodulação de feijão-caupi, para a

variedade BRS Guariba e observaram o aumento desse parâmetro, além do acúmulo de N na parte aérea.

Angelim e BRS Xique-Xique tratadas com *Bradyrhizobium* sp. e *B. methylotrophicus*, respectivamente, expressaram maior quantidade de massa fresca da parte aérea quando comparada aos demais tratamentos (Figura 7).

Figura 7: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) na massa fresca da parte aérea de cultivares tradicionais e biofortificadas.

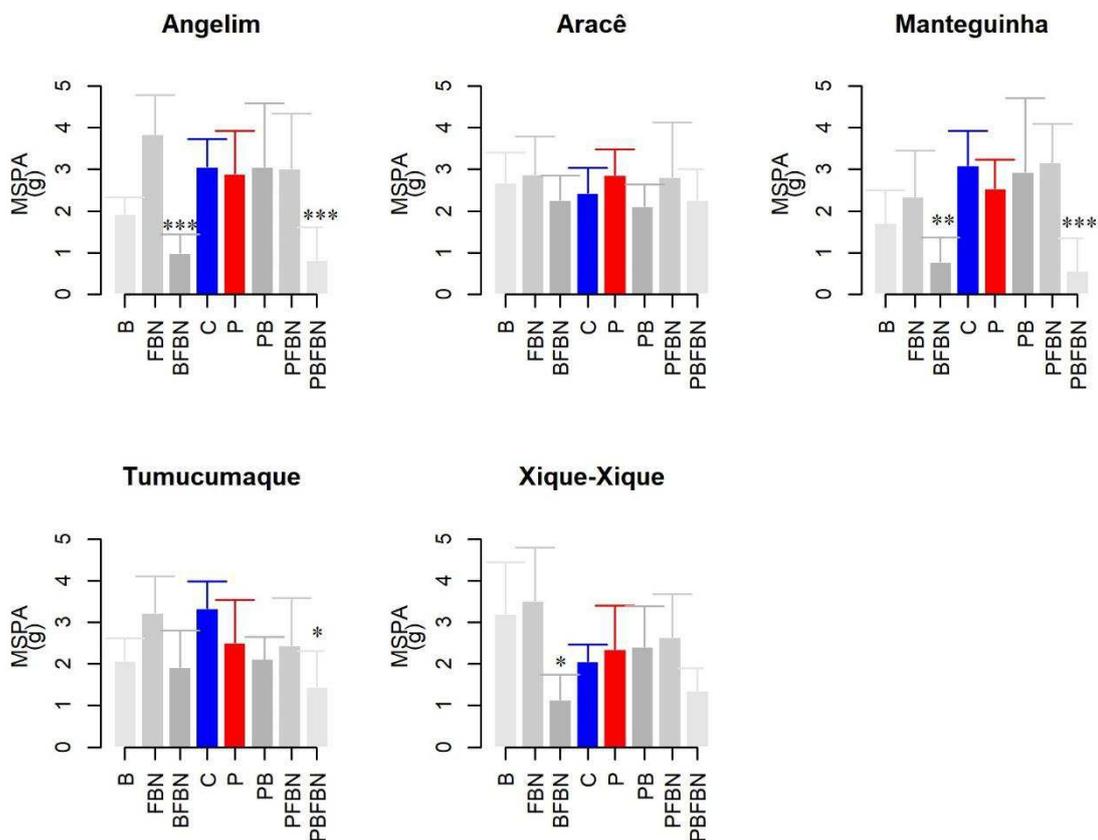


0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Os resultados da massa seca da parte aérea não se mantiveram após o processo de secagem para Angelim e BRS Xique-Xique tratadas com *Bradyrhizobium* sp. e *B. methylotrophicus*. Para a massa seca os resultados com interação estatística significativas se deram através de menores valores para Angelim, Manteguinha e BRS Tumucumaque quando

houve interações das três variáveis (PBFBN). Além dos resultados para as variedades tratadas com *Bradyrhizobium* sp.; *B. methylotrophicus* e *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* (PBFBN) que mantiveram os menores valores de massa antes e após a secagem para Angelim, Manteguinha e BRS Tumucumaque, o mesmo observado quanto ao número de folhas, logo se entende que a menor quantidade de folhas observada nesse tratamento refletiu nos parâmetros de massa seca e fresca (Figura 8).

Figura 8: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Fusarium oxysporum* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Fusarium oxysporum* (PBFBN) na massa seca da parte aérea de cultivares tradicionais e biofortificadas.



0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Esses dados discordam dos resultados observado por De Araújo et al. (2012), onde demonstraram que houve aumento da massa seca na parte aérea em plantas de feijão-caupi para a variedade BRS Guariba, com sementes microbiolizadas com *Bacillus subtilis*. Araújo (2008)

chegou à mesma conclusão para a soja [*Glycine max* (L.) Merr.], milho (*Zea mays* L.) e algodão (*Gossypium hirsutum* L.).

Bandeira et al., (2017) observaram que a inoculação de *Bradyrhizobium elkanni* em sementes foi capaz de aumentar a massa seca de plantas de feijão-caupi da variedade Novaera, discordando de nossos resultados. Nossa estirpe de *Bradyrhizobium* sp. foi capaz de incrementar, quanto ao seu efeito isolado: a altura, o número de folhas e o comprimento da raiz. Embora tenha expressado um aumento para algumas variedades quanto a massa seca, não houve significância estatística para essa variável. No entanto, essa expressividade para tais parâmetros de crescimento podem ser explicados pelo potencial promotor de crescimento vegetal de espécies do gênero *Bradyrhizobium* sp. (RODRIGUES et al., 2012).

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam o potencial biocontrolador de *B. methylotrophicus* tanto *in vitro* como *in vivo* (casa-de-vegetação) para a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. A microbiolização de sementes com *Bradyrhizobium* sp. proporcionou aumento na altura das plantas, número de folhas, comprimento da raiz e número de nódulos, para Angelim e BRS Tumucumaque. A aplicação de *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. confere uma alternativa sustentável para melhoria do desempenho vegetal e auxílio no manejo dos sistemas produtivos de feijão-caupi. Estudos posteriores, devem avaliar a eficácia desses métodos em pesquisas realizadas no campo e para outros patossistemas.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, M.; DHEEMAN, S.; DUBEY, R. C.; KUMAR, P.; MAHESHWARI, D. K.; BAJPAI, V. K. Differential antagonistic responses of *Bacillus pumilus* MSUA3 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* causing fungal diseases in *Fagopyrum esculentum* Moench. **Microbiol Res**, 205:40–47. 2017.
- ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis*, formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 456-462, 2008.
- ARAÚJO, L. B. R. **Potencial genético de variedades tradicionais de feijão-caupi e avaliação para resistência à murcha-de-Fusarium**. 2017. 88 p. Dissertação Mestre em Agronomia/Fitotecnia - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.
- BANDEIRA, A. S; CASTRO FILHO, M. N.; AMARAL, M. C. A.; MENEZES, A. T.; OLIVEIRA, C. C.; MORAIS, O. M. **Evaluation of cowpea productivity with and without inoculation**. VI Congresso Latiamericano de Agroecologia. 2017.
- BASTOS, V. J.; MELO, D. A.; ALVES, J. M. A.; UCHÔA, S. C. P.; DA SILVA, P. M. C.; JUNIOR, D. L. T. Avaliação da fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi submetido a diferentes manejos da vegetação natural na savana de Roraima. **Revista Agro@ mbiente Online**, v. 6, n. 2, p. 133-139, 2012.
- BOJÓRQUEZ-ARMENTA, Y. J. et al. Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. **Journal of General Plant Pathology**, v. 87, n. 6, p. 377-386, 2021.
- CAMPOS NETO, J. R. M.; CHAVES, R. R.; SARDINHA, D. H. S.; MELO, G. DE L. LUIZ.; RODRIGUES, A. A. C. Bacterial formulations in induction of resistance and growth promotion of tomato plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 10, 2018.
- CHOWDHURY, S. P.; DIETEL, K.; RÄNDLER, M.; SCHMID, M.; JUNGE, H.; BORISS, R.; HARTMANN, A.; GROSCHE, R. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. **PLoS One**, v. 8; n.7, 2013.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. SAFRA 2021/2 - Décimo segundo levantamento | SETEMBRO 2022, v. 7, n. 12. Brasília. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acesso em 18 fev. 2022.

- DE ARAÚJO, F. F.; DE ARAÚJO, A. S. F.; DE SOUZA, M. R. Inoculação do feijão-caupi com rizobactérias promotoras de crescimento e desempenho na produção de biomassa. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 17, n. 1, p. 53-58, 2012.
- DONG, J.; SONG, Y.; WANG, B.; WU, X.; WANG, Y.; WANG, J.; WANG, H. Identification of Genomic Regions Associated with Fusarium Wilt Resistance in Cowpea. **Applied Sciences**, v. 12, n. 14, p. 6889, 2022.
- FAWOLE, E.A. Evaluation of cowpea lines for resistance to wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*. **Fitopatol. Brasileira**, n.14, p.232- 234. 1989.
- FERREIRA, A. S.; SOUSA, R. M.; BATISTA, V. K. M.; LIMA, M. L. P. Fungicidas no controle da fusariose vascular do feijão-caupi. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada*, v. 14, n. 4, p. e2333, 2020.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. 1 ed. Teresina: Embrapa Meio- Norte, 2011. 84 p.
- GU, Q. et al. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 19, p. e01075-17, 2017.
- GUALTER, R. M. R. et al. Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.
- HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, 36 p. (Documentos, 325). 2011.
- JEYAKUMAR, John Martin Jerome; ZHANG, Muqing. *Bacillus Amyloliquefaciens* (RO) the Source of Antimicrobial Compounds of Sugarcane Pathogen. **Himalayan Journal of Agriculture**, v. 3, n. 1, 2022.
- LIMA, André Suêlto Tavares de et al. Sinergismo *Bacillus*, *Brevibacillus* e, ou, *Paenibacillus* na simbiose *Bradyrhizobium*-caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 713-721, 2011.
- MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R.; Silveira, E. B. (Eds.) **Manual de práticas em Fitobacteriologia**. 2a Ed. Recife PE. Universidade Federal Rural de Pernambuco. pp. 67-109. 2005.

MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.

MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. *Journal of Agricultural Research*, v. 26, n.5, p. 195-218, 1923.

NORONHA, M. D. A.; LOPES, C. L. R. B. P.; de OLIVEIRA, B. M. M.; VENTURA, H.; TÔRRES, R.; MICHEREFF, S.; SILVA, K. **Reação de genótipos de feijão-caupi a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii***. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 3, 2013, Recife. Feijão-Caupi como alternativa sustentável para os sistemas produtivos familiares e empresariais. Recife: IPA, 2013.

PEREIRA, J.; MIRIAN, L.; AURELIANO, E.; RODRIGUES, J.; LEITE, J.; CARVALHO, F.; SANTOS, M. & DA PAZ, C. **Interação de *Rhizobium* com bacterias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) na cultura de feijao caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.)**. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 11., Fortaleza, 2008. Anais... Fortaleza, 2008.

PIO-RIBEIRO, G.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do feijão caupi. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE J. A. M. (Eds.) **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Ceres, v. 2, 1997. p. 222–232.

ROCHA, H. G. Da S.; CASTRO, H. S.; FREITAS, J. R. B. Resposta de feijão-caupi à inoculação com estirpe de rizóbio. **Revista Mundi Meio Ambiente e Agrárias (ISSN: 2525-4790)**, v. 4, n. 2, 2020.

RODRIGUES, A. A. C.; BEZERRA NETO, E.; COELHO, R. S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 492-499, 2006.

RODRIGUES, A. C.; ANTUNES, J. E. L.; MEDEIROS, V. V.; BARROS, B. G. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Revista Bioscience Journal**, v. 28, 2012.

SHARMA C.K.; VISHNOI, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI D. K. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. **Rhizosphere**, 5:71–75. .2018.

SILVA, R. D. C. Z.; SILVA, A. C. D.; CARVALHO, R.; COSTA, A. F. D.; NICOLI, A.; RIOS, J. A. IDENTIFICATION OF COWPEA GENOTYPES RESISTANT TO FUSARIUM WILT. **Revista Caatinga**, v. 34, p. 957-964, 2021.

SCHOONHOVEN, A.V.; PASTOR-CORRALES, M.A. Standard system for the evaluation of bean germplasm. **Cali: CIAT**, 1987. 53p.

SOUZA, A. C. M. et al. Biological nitrogen fixation stability of cowpea cultivars with tropical semi-arid rhizobial strains. **Revista Caatinga**, v. 34, p. 359-369, 2021.

YADAV, K. et al. Effective biocontrol of banana fusarium wilt tropical race 4 by a bacillus rhizobacteria strain with antagonistic secondary metabolites. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100341, 2021.



CAPÍTULO IV

CAPÍTULO IV - *Bacillus methylotrophicus* como biocontrole de *Sclerotium rolfsii* Sacc e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e promoção de crescimento em variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi microbiolizadas com *Bradyrhizobium* sp.

Artigo escrito de acordo com as normas da revista “Biological Control”

Bacillus methylotrophicus como biocontrole de *Sclerotium rolfsii* Sacc e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e promoção de crescimento em variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi microbiolizadas com *Bradyrhizobium* sp.

Larisse Raquel Carvalho Dias

Antonia Alice Costa Rodrigues

Eliza Gonçalves de Sousa

Luis Manuel Hernández García

Leonardo de Jesus Machado Gois de Oliveira

Erlen Keila Candido e Silva

Ruan Ithalo Ferreira Santos Cavalcante

RESUMO

Um dos principais fatores limitantes da produção do feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] está relacionado ao aspecto fitossanitário e ao controle das doenças dessa cultura que é a base de agroquímico, nesse sentido o uso de rizobactérias evidencia uma alternativa sustentável. O objetivo desse trabalho foi avaliar a ação de *Bacillus methylotrophicus* sobre *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* em condições de laboratório e em variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi, enriquecidas com o *Bradyrhizobium* sp. em casa de vegetação, como estratégias no manejo de doenças e promoção de crescimento. A avaliação do antagonismo de *B. methylotrophicus* *in vitro* ocorreu pelo método do pareamento em círculo. Sementes de três variedades tradicionais e três cultivares biofortificadas foram microbiolizadas com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp., inoculados com *S. rolfsii* e *M. phaseolina* e semeadas em casa de vegetação. Foram avaliados os parâmetros de crescimento: altura, massa fresca e seca da parte aérea e raiz, número de folhas e número de nódulos. No presente estudo, *B. methylotrophicus* demonstrou potencial inibidor *in vitro* e *in vivo* para *S. rolfsii* e *M. phaseolina*. Essas rizobactérias também exerceram o biocontrole quando coinoculadas nas sementes. A microbiolização de sementes com *Bradyrhizobium* sp. proporcionou aumento da altura das plantas, massa fresca e seca da parte aérea e raiz, número de folhas e número de nódulos tanto para as variedades como para as cultivares, na variedade Manteguiinha e nas cultivares BRS Aracê e BRS Xique-Xique houve acréscimo desses parâmetros também quando co-microbiolizados com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. Esse acréscimo também ocorreu para a massa fresca da raiz mesmo nos tratamentos com *Bradyrhizobium* sp. e inoculação de *S. rolfsii*. Além disso, *B. methylotrophicus* promoveu uma maior massa fresca da raiz em Angelim, Manteguiinha e BRS Aracê quando aplicado individualmente. Portanto, *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. tem potencial como agentes de biocontrole e promotores de crescimento para a cultura do feijão-caupi, configurando-se uma alternativa importante para a sustentabilidade agrícola e ambiental.

Palavras chaves: *Vigna unguiculata*, murcha de esclerócio, podridão-cinzenta do caule, rizobactérias.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L) Walp] é cultivado no Brasil com maior concentração nas regiões Norte e Nordeste. Essa cultura tem relevante importância socioeconômica, principalmente para os agricultores familiares, isso se deve ao seu alto valor nutricional em proteínas, aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais e fibras (FREIRE FILHO et al., 2011).

No entanto, um dos principais fatores limitantes da produtividade dessa cultura está relacionado ao aspecto fitossanitário. As doenças fúngicas têm grande impacto nas lavouras de feijão-caupi, do cultivo no campo até o armazenamento, pois existem fitopatógenos que afetam desde a semente, os estágios vegetativos até a fase reprodutiva muitas vezes dando continuidade no seu ciclo de transmissibilidade através das sementes. Dentre as doenças fúngicas, se destacam a podridão-cinzenta do caule e a murcha de esclerócio, causadas por *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. e *Sclerotium rolfsii* Sacc, respectivamente. Estas doenças, estão entre as mais destrutivas para a cultura, ocasionam morte de plantas e conseqüentemente interferem na produtividade (ATHAYDE SOBRINHO, 2016). Ocorrem em grande parte das áreas onde a espécie é cultivada, se tornando cada vez mais notável para a cultura, justificando o desenvolvimento de trabalhos que visem seu controle (MICHEREFF et al., 2005).

A utilização de inoculantes constituído por bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio (FBN), como *Bradyrhizobium* sp., são recomendados para o feijão-caupi, devido ao seu potencial para aumento da produtividade. Esse ganho varia de 40 e 52%, em condições experimentais de campo (ROCHA et al., 2009). Além disso, essa bactéria promove um fornecimento sustentável de N à cultura, que também é um aspecto fundamental para um melhor rendimento dos grãos (ZILLI et al., 2008).

Outra rizobactéria benéfica para a cultura são as do gênero *Bacillus*, destacando-se pelo número de espécies que oferecem vários mecanismos de antagonismo, proporcionando biocontrole a fitopatógenos, além da sua capacidade de promover crescimento (SHAHID et al., 2021; SHARMA et al., 2018). Esse gênero possui bactérias importantes para o crescimento vegetal, mediado por mecanismos como a produção de fitohormônios estimuladores do crescimento (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011). *Bacillus methylotrophicus* tem potencial promotor de crescimento e de produtividade vegetal que está relacionado com sua capacidade de solubilizar fósforo e o zinco, convertendo mais elementos nas formas biodisponíveis (SHAHID et al., 2021).

Diante do exposto o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação de *Bacillus methylotrophicus* sobre *Sclerotium rolfsii* e *Macrophomina phaseolina* em condições de laboratório e em casa de vegetação nas variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi, enriquecidas com o *Bradyrhizobium* sp. como estratégias no manejo de doenças e promoção de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Fitopatologia e na casa de vegetação da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus Paulo VI, São Luís, coordenadas 2° 59 “19” S, 44° 21 “20” W, no período de janeiro a abril de 2022.

Avaliação antagonista de *B. methylotrophicus* a *S. rolfsii* e *M. phaseolina* in vitro pelo método do pareamento em círculo.

Para o estudo do efeito antagonista de *B. methylotrophicus* sobre *S. rolfsii* e *M. phaseolina*, um isolado de *B. methylotrophicus* (MGSS 276), dois isolados de *S. rolfsii* (MGSS 166 e 398) e quatro isolados de *M. phaseolina* (MGSS 346, MGSS 347, MGSS 348 e MGSS 349) foram obtidos da coleção de microrganismos do Laboratório de Fitopatologia/UEMA. Foram realizados dois experimentos *in vitro*, pelo método de pareamento em círculo. Inicialmente, o isolado de *B. methylotrophicus* foi cultivado em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Ágar) por 48 h e os isolados dos fitopatógenos por sete dias, após este período de cultivo foram transferidos assepticamente para o centro de placas de Petri com 90 mm de diâmetro contendo meio de cultura BDA, um disco de 6,0 mm de diâmetro do fitopatógeno. Em seguida, com auxílio de um anel volumétrico de alumínio estéril, foram repicadas a cultura bacteriana, na mesma placa, com diâmetro aproximado de 50 mm. Para os tratamentos controles somente o fitopatógeno foi cultivado em meio BDA.

A avaliação foi efetuada durante dez dias, pela inibição do crescimento micelial, para isso foram efetuadas medições do diâmetro das colônias fúngicas, em dois sentidos diametralmente opostos, com auxílio de uma régua milimetrada. O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro tratamentos para *M. phaseolina* e dois tratamentos para *S. rolfsii* ambos com seis repetições.

A percentagem de inibição do crescimento micelial (P.I.C) foi calculada pela fórmula de Menten et al. (1976), onde:

$$\text{PIC} = \frac{\text{Crescimento da testemunha} - \text{Crescimento tratamento}}{\text{Crescimento da testemunha}} \times 100$$

Tratamento das sementes de feijão-caupi

Para os experimentos foram utilizadas sementes de três variedades tradicionais (Angelim, Mercado e Manteiguinha) e três biofortificadas (BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique).

No experimento com o inoculante, as sementes foram microbiolizadas com a estirpe comercial de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6462, autorizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para uso na cultura do feijão-caupi. O inoculante mantido a 24 °C, foi agitado por um minuto a 150 rpm para em seguida microbiolizar as sementes, seguindo a quantidade recomendada pelo fabricante de 150 ml/ 50 kg. Após microbiolizadas, as sementes foram agitadas por um minuto a 150 rpm para melhor distribuição do produto e colocadas para secar em temperatura ambiente. Além disso, a viabilidade do lote comercial de *Bradyrhizobium* sp. foi avaliada antes do processo de microbiolização das sementes, a partir do microcultivo pelo método de risca dessas bactérias em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) e análise do crescimento *in vitro* após 24 h, segundo a metodologia descrita por Mariano e Assis, (2005).

Para o processo de microbiolização com a bactéria *B. methylophilus*, esta foi multiplicada em meio de cultura BDA e mantida em câmara tipo BOD para crescimento por 48h a 28 °C e fotoperíodo de 12h. Em seguida, foi preparada a suspensão bacteriana diluída em Cloreto de Sódio a 0,85% e concentração ajustada para 10⁸ UFC ml⁻¹, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm e absorvância de 0,5. As sementes das variedades de feijão-caupi foram imersas, por um minuto sob agitação constante a 150 rpm, em suspensão preparada com a bactéria. Foi utilizado ainda, nas variedades o tratamento de coinoculação (Inoculante comercial *Bradyrhizobium* sp.+ isolado MGSS 276 de *B. methylophilus*).

Logo após a secagem, as sementes foram semeadas em vasos de capacidade de 3 kg, contendo solo e esterco bovino na proporção 3:1, previamente autoclavado a 120°C por 2h. Após 15 dias foi feito o desbaste deixando-se três plantas por vaso.

Preparo do inóculo e avaliação da doença

Para o preparo do inóculo, apenas um isolado de cada patógeno foi selecionado conforme melhor desenvolvimento após os testes *in vitro*. Os isolados de *S. rolfii* (MGSS 166) e *M. phaseolina* (MGSS 346) foram previamente cultivados por sete dias em placas de Petri

contendo meio de cultura BDA, mantidas em BOD a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, sob o regime de alternância luminosa (12h claro/12h escuro). Após o cultivo em BDA, sete discos com cerca de 5 mm contendo estrutura dos patógenos foram transferidos para o substrato arroz com casca. Para esse substrato, foram utilizados 100 g de grãos arroz com casca e 100 ml de água destilada estéril, autoclavados em Erlenmeyers a 120°C durante 20 minutos (SONGA et al., 1997), em seguida, incubado em B.O.D sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, a colonização do fungo nos grãos de arroz ocorreu durante 10 dias.

A inoculação dos patógenos ocorreram junto com o plantio do feijão-caupi. Para *S. rolfsii* foram colocados dois grãos de arroz colonizados com o patógeno, no centro do vaso. Para *M. phaseolina* três grãos de arroz colonizados foram colocados sobre a semente. Logo após a inoculação os vasos foram mantidos durante 48 h em câmara úmida.

Os sintomas da murcha de esclerócio (*S. rolfsii*) foram avaliados 20 dias após a inoculação, através da incidência, visto que não possui escala de notas conhecida para esta doença. Durante a avaliação foi realizada a contagem das plantas com sintomas de necrose, constrição no colo e morte das plântulas devido ao ataque do fungo.

As plantas com sintomas de podridão-cinzenta do caule (*M. phaseolina*) foram avaliadas aos 20 dias após a inoculação, utilizando-se uma escala que varia de 0 a 5 adaptada de Abawi e Pastor-Corrales (1990), em que: 0 = ausência de sintomas; 1 = lesões limitadas aos tecidos cotiledonares; 2 = lesões radiculares, cotiledonares e/ou alcançando os tecidos do hipocótilo em aproximadamente 2,0 cm; 3 = lesões acima de 2,0 cm de comprimento na região do colo da planta; 4 = caule com todo o seu diâmetro colonizado pelo fungo e/ou com presença de picnídios; 5 = sementes não germinadas e tombamento de plântulas.

A partir dos dados obtidos com a escala de notas, foram calculados o índice de severidade da doença (SVD) pela equação 1, descrita por McKinney (1923).

$$SVD = [(N1)+(N2 \times 2)+(N3 \times 3)+(N4 \times 4)/(N0+N1+N2+N3+N4) \times k] \times 100$$

Em que: N0 é o número de plantas com doença na categoria 0, N1 é o número de plantas com doença na categoria 1, N2 é o número de plantas com doença na categoria 2, N3 é o número de plantas com doença na categoria 3, N4 é o número de plantas com doença na categoria 4, N5 é o número de plantas com doença na categoria 5 e k é o número de categorias (4).

Na murcha de esclerócio foi avaliado a incidência da doença e os dados transformados em porcentagem. Enquanto para a podridão-cinzenta foi calculado o índice de severidade, sendo os dados submetidos a análise de variância, e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software R.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, onde para a avaliação do ensaios de biocontrole foram utilizadas seis variedades (Angelim, Mercado, Manteiguinha, BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique) e quatro tipos de tratamentos das sementes (Controle, *B. methylotrophicus*, *Bradyrhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. + *B. methylotrophicus*) perfazendo um total de 24 tratamentos com quatro repetições cada, sendo a unidade experimental um vaso contendo três plantas.

Avaliação da promoção de crescimento

Foi avaliado ainda a promoção de crescimento, onde os parâmetros de crescimento foram mensurados 60 dias após o plantio, os quais são: a) altura de planta, expressa em cm, medida com régua milimetrada, a partir do coleto até a gema apical; b) massa fresca e massa seca da parte aérea e da raiz, expressa em grama, pesada em balança com precisão de 0,001g; Para determinação da massa seca, o material vegetal foi conduzido à estufa com circulação forçada de ar à temperatura de 65°C até atingir peso constante; c) número de folhas; d) número de nódulos, contados após retirada e lavagem da raiz.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com três variedades tradicionais (Angelim, Mercado e Manteiguinha) e três biofortificadas (BRS Aracê, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique) com 48 tratamentos e quatro repetições para cada patógeno (*S. rolfsii* e *M. phaseolina*), sendo a unidade experimental um vaso contendo três plantas, conforme descrição a seguir: Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com Patógeno (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com Patógeno (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com Patógeno (PBFBN).

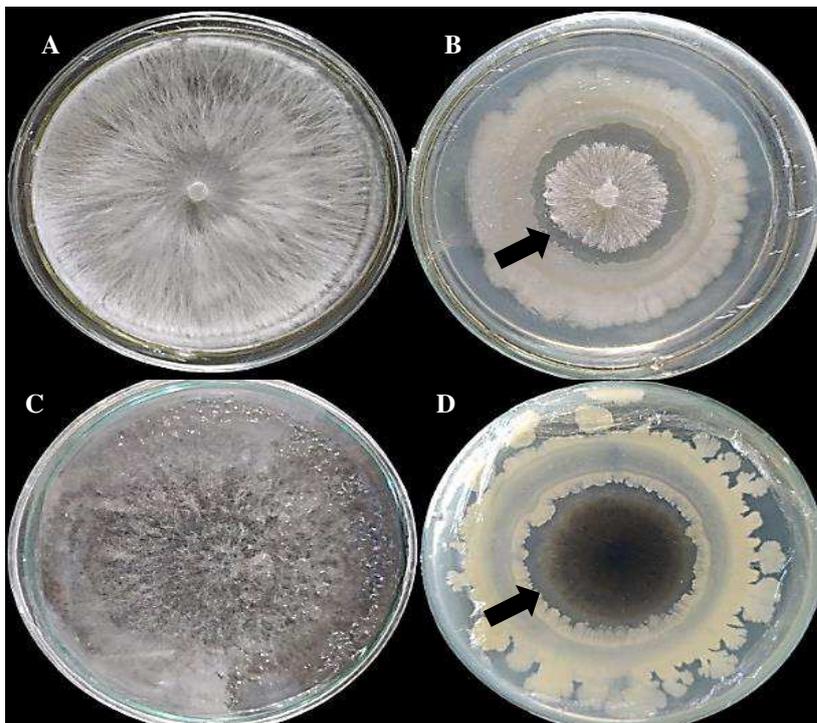
As médias dos parâmetros de crescimento foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas (Dunnets) e todas as análises foram realizadas utilizando o software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste *in vitro*, houve formação de um halo de inibição do crescimento fúngico formado pelo crescimento bacteriano, onde demonstra que os patógenos não cresceram além

da barreira imposta por *B. methylotrophicus*. Assim, podemos observar a eficiência da atividade antagonista *in vitro* de *B. methylotrophicus* sobre *S. rolfsii* e *M. phaseolina*, (Figura 1).

Figura 1: Efeito antagônico de *B. methylotrophicus* (MGSS 276) contra *S. rolfsii* e *M. phaseolina* em meio de cultura BDA, (A) Testemunha de *S. rolfsii*; (B) antagonismo sobre *S. rolfsii*; (C) testemunha de *M. phaseolina*; (D) antagonismo sobre *M. phaseolina*, pelo método do pareamento em círculo



B. methylotrophicus foi eficiente em inibir o crescimento micelial de diferentes isolados de *S. rolfsii* e *M. phaseolina* em até 62% e 85%, respectivamente (Tabela 1 e 2).

Tabela 1 Percentagem de inibição do crescimento micelial (cm) em isolados do fungo *S. rolfsii* pelo isolado bacteriano de *B. methylotrophicus* (MGSS 276) após sete dias de avaliação.

Isolados fúngicos	<i>B. methylotrophicus</i> Taxa de inibição (%)
<i>S. rolfsii</i>	
MGSS 166	57.59±10.28a
MGSS 398	62.21±14.05a

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O percentual de inibição manteve-se alto para ambas espécies patogênicas, que atingindo valores a partir de 57% nos isolados testados (Tabela 1 e 2). Todos os tratamentos que receberam *B. methylotrophicus* diferiram estatisticamente do tratamento controle.

Tabela 2 Percentagem de inibição do crescimento micelial (cm) em isolados do fungo *M. phaseolina* pelo isolado bacteriano de *B. methylotrophicus* (MGSS 276) após sete dias de avaliação.

Isolados fúngicos	<i>B. methylotrophicus</i> Taxa de inibição (%)
<i>M. phaseolina</i>	
MGSS 346	73.33±10.87a
MGSS 347	85.43±4.21a
MGSS 348	70.25±12.09a
MGSS 349	75.68±9.07a

Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados corroboram com Bojórquez-Armenta et al., (2021) que avaliaram o efeito antagonista de bactérias do gênero *Bacillus* spp. contra *M. phaseolina in vitro* e relataram a inibição no crescimento micelial variando de 62,5 a 85%.

Romano et al., (2013) observaram que *Bacillus amyloliquefaciens* reduziu o crescimento micelial em 57%, 43%, 38% e 54% de *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium italicum*, respectivamente. Relacionando essa inibição a lipopeptídeos cíclicos da família das surfactinas.

Gu et al., (2017) verificaram o biocontrole de *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium graminearum* através da inibição do crescimento micelial desse patógeno, esse potencial inibitório foi relacionado ao lipopeptídeo bacilomicina-D, que foi extraído de *B. amyloliquefaciens* e analisado isoladamente, mostrando que a atividade inibitória do patógeno aumentou de acordo com a concentração do lipopeptídeo. Nos resultados desses autores, a bacilomicina-D, foi capaz de causar morte celular e degradar o micélio do patógeno, inibindo tanto seu potencial vegetativo quanto reprodutivo.

Shahid et al. (2021) ao avaliarem *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* e *B. tequilensis* observaram a inibição de *F. oxysporum* em 86%, 64% e 50 %, respectivamente. Também detectaram a produção dos metabólitos antifúngicos: surfactinas, iturinas, fengicinas,

macrolactinas, bacilomicina-D e sideróforo bacilibactina à base de catecol que foram posteriormente confirmados pela amplificação dos genes envolvidos na biossíntese desses lipopeptídeos antimicrobianos.

Biocontrole da murcha de esclerócio e da podridão-cinzenta do caule utilizando *B. methylotrophicus* em variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi, acrescidas ou não com *Bradyrhizobium* sp. em casa de vegetação

A incidência da murcha de esclerócio foi menor nos tratamentos em que houve microbiolização das sementes com *B. methylotrophicus* para as variedades Angelim, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique com 6,25%, 12,5% e 6,25%, respectivamente, quando comparadas com o tratamento controle (variedade + patógeno). A variedade BRS Aracê, apresentou incidência do patógeno somente nos tratamentos em que houve microbiolização de *Bradyrhizobium* sp. (Tabela 3) provavelmente a ausência de incidência da doença nos outros tratamentos ocorre devido uma possível resistência da variedade à murcha de esclerócio.

Nossos resultados discordam de Figueredo et al. (2017), que concluíram que a coinoculação com *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp. foi eficiente em reduzir a incidência de *S. rolfsii* em plantas de amendoim.

Tabela 3 Ação de *B. methylotrophicus* em variedades e cultivares de feijão-caupi microbiolizadas ou não com *Bradyrhizobium* e inoculadas com *S. rolfsii*.

	Testemunha (<i>S. rolfsii</i>)	<i>S. rolfsii</i> + <i>B. methylotrophicus</i>		<i>S. rolfsii</i> + <i>B. methylotrophicus</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp.		<i>S. rolfsii</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp.	
		INC (%)	Controle (%)	INC (%)	Controle (%)	INC (%)	Controle (%)
Angelim	43,75	37,5	6,25	62,5	0	56,25	0
Manteiguinha	12,5	18,75	0	31,25	0	37,5	0
Mercado	25	37,5	0	50	0	56,25	0
BRS Aracê	0	0	0	25	0	31,25	0
BRS Tumucumaque	18,75	6,25	12,5	37,5	0	43,75	0
BRS Xique-Xique	12,5	6,25	6,25	50	0	56,25	0

Nossos resultados corroboram com Yadav et al., (2021), que avaliaram o efeito *in vivo* de *Bacillus licheniformis* sobre *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense Tropical Race 4 em bananeira e observaram que essa bactéria promoveu a redução de 10% na incidência da doença.

O percentual de controle para a podridão-cinzenta do caule na variedade Angelim foi de 33,33% tanto quando inoculadas com *B. methylotrophicus* isoladamente, como quando coinoculadas com *B. methylotrophicus* + *Bradyrhizobium* sp. Para as variedades Manteguinha e para a cultivar BRS Aracê o percentual de controle foi de 12,5 % e 25% respectivamente, quando inoculadas *Bradyrhizobium* sp. e coinoculados com *B. methylotrophicus* + *Bradyrhizobium* sp. A variedade Mercado e BRS Tumucumaque teve o percentual controle de 25% e 14,28 %, respectivamente, quando tratada apenas com *B. methylotrophicus*. A biofortificada BRS Xique-Xique teve o maior percentual de controle quando tratada apenas com *Bradyrhizobium* sp. (Tabela 4).

Tabela 4 Ação de *B. methylotrophicus* em variedades e cultivares de feijão-caupi microbiolizadas ou não com *Bradyrhizobium* e inoculadas com *M. phaseolina*.

	Testemunha <i>M. phaseolina</i>	<i>M. phaseolina</i> + <i>B. methylotrophicus</i>		<i>M. phaseolina</i> + <i>B. methylotrophicus</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp.		<i>M. phaseolina</i> + <i>Bradyrhizobium</i> sp.		
	Severidade	Severidade	Controle (%)	Severidade	Controle (%)	Severidade	Controle (%)	Total
Angelim	1,88	0,94	33,33	0,56	33,33	1,19	0,00	1,14 b
Manteiguinha	3,69	2,88	0,00	2,56	12,50	3,94	12,50	3,26 a
Mercado	2,06	0,88	25,00	1,56	0,00	2,56	0,00	1,76 b
BRS Aracê	1,38	0,88	18,75	2,31	25,00	3,00	25,00	1,89 b
BRS Tumucumaque	4,19	2,44	14,28	2,63	0,00	4,13	0,00	3,34 a
BRS Xique-Xique	2,88	2,00	0,00	1,38	40,00	1,75	46,66	2,00 b
Total	2,67 a	1,66 b	-	1,83 b	-	2,76 a	-	
CV (%)								6,06

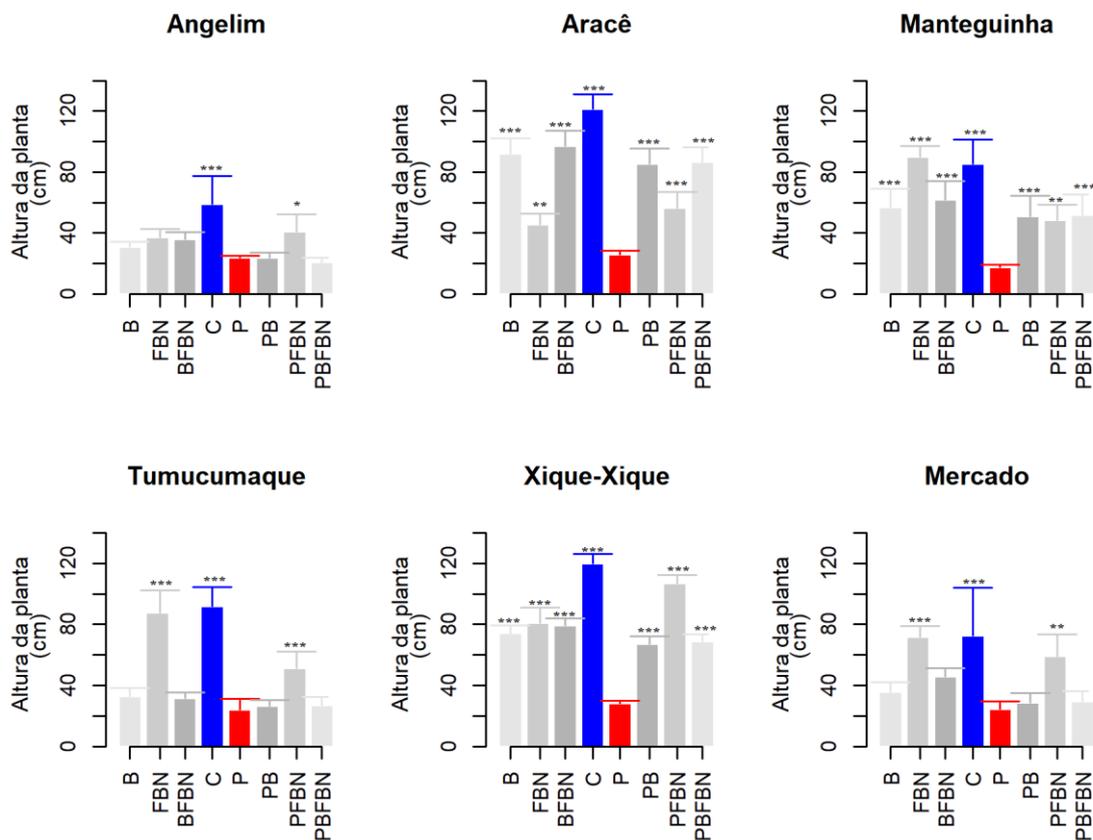
Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam diferença estatística entre as variedades e cultivares e maiúsculas diferenças dos tratamentos dentro da cada variedade e cultivar.

Concordamos com Ghoniem e Belal (2013), quanto aos nossos resultados para *B. methylotrophicus*, esses autores avaliaram o biocontrole *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus subtilis* sobre *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Macrophomina phaseolina* e observaram redução do percentual de expressão da doença na pré e pós-emergência. Nossos dados corroboram com Kumar et al. (2021), que avaliaram o biocontrole de *Bacillus cereus* sobre a podridão cinzenta causada por *M. phaseolina* em plantas de *Vigna mungo* e observaram redução significativa do índice de gravidade da doença. Tais autores relacionaram esse efeito controlador ao biossurfactante de siloxano cíclico, que foi extraído da bactéria e analisado isoladamente, comprovando ser a substância capaz de reduzir a severidade da doença e dentre os mecanismos envolvidos está a deterioração das hifas fúngicas. Além disso, também relatam que o efeito biocontrolador associados ao gênero *Bacillus*, provavelmente, está relacionado com a capacidade de produção de vários metabólitos antifúngicos (ROMANO et al. 2013; SHAHID et al. 2021; GU et al. 2017).

Parâmetros de crescimento das variedades tradicionais e cultivares biofortificadas de feijão-caupi tratadas com *B. methylotrophicus*, acrescidas ou não com *Bradyrhizobium* sp. e inoculadas com *S. rolfsii* e *M. phaseolina* em casa de vegetação

Quanto a altura das plantas somente a variedade Manteiguinha respondeu ao tratamento com *Bradyrhizobium* sp., apresentando uma maior altura de planta quando comparada ao tratamento controle. Todos os tratamentos que foram inoculados com *S. rolfsii* tiveram a altura reduzida quando comparada aos demais tratamentos dentro de cada variedade (Figura 2).

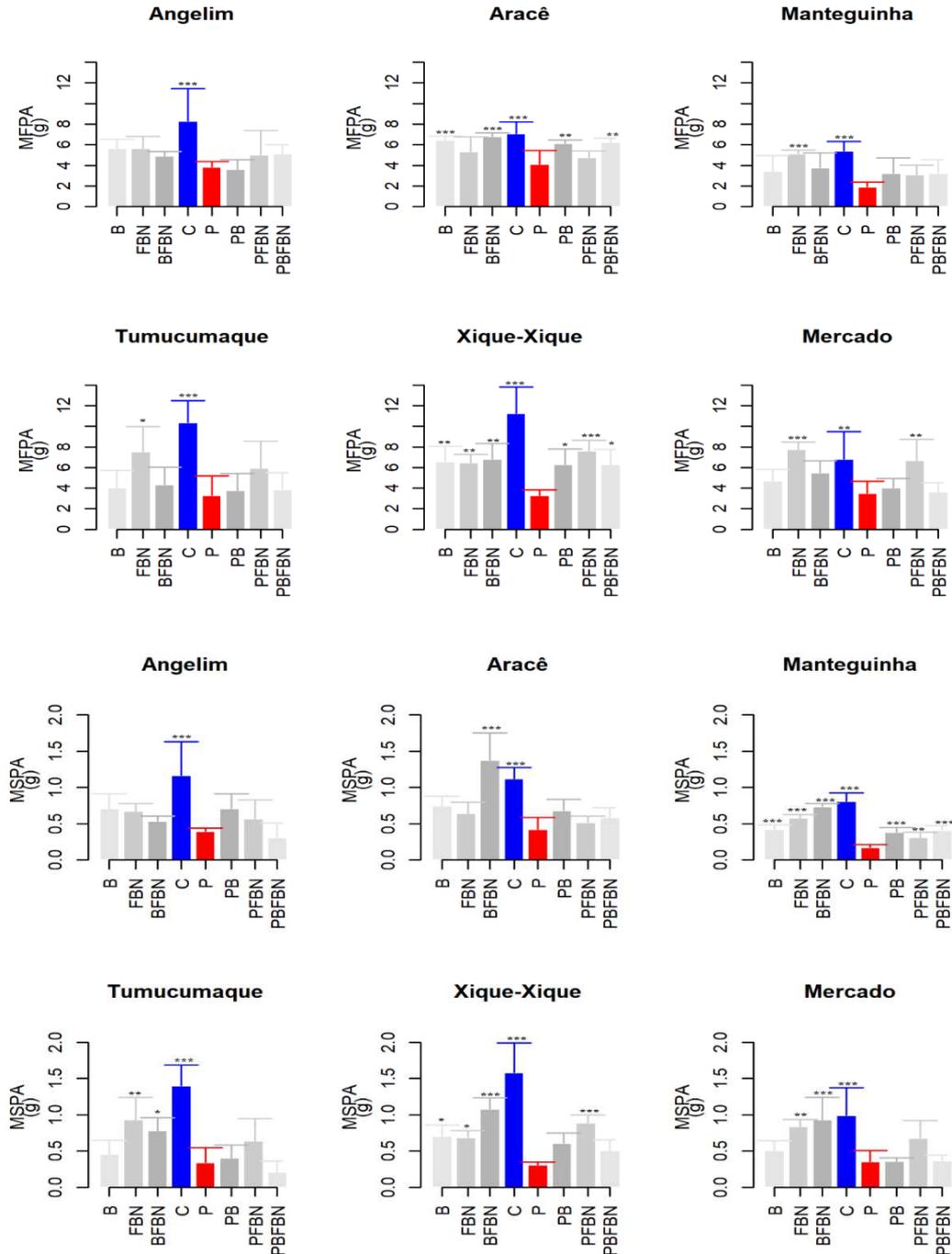
Figura 2: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PBFBN) na altura das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.



0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Na massa fresca da parte aérea somente a variedade Mercado tratada com *Bradyrhizobium* sp., diferiu do tratamento controle. Para a massa seca da parte aérea somente a variedade BRS Aracê coinoculada com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. diferiu do tratamento controle. Todos os tratamentos que foram inoculados com *S. rolfsii* tiveram uma menor massa fresca e seca (Figura 3).

Figura 3: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PBFBN) na massa fresca e seca da parte aérea das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.

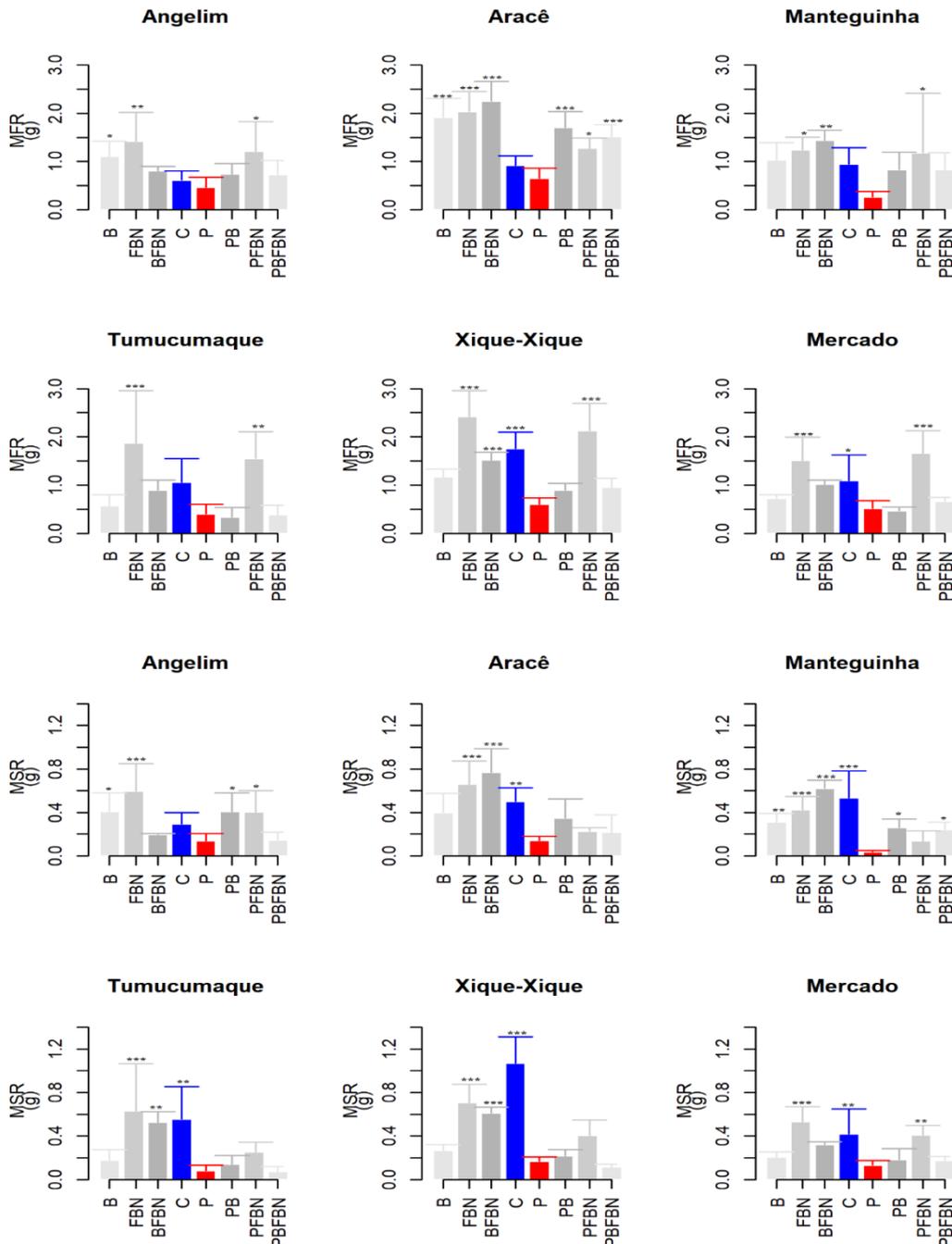


0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnnett), As barras representam o desvio padrão.

As variedades Angelim, Manteguinha e BRS Aracê apresentaram maior massa fresca da raiz em todos os tratamentos em que houve coinoculação com *B. methylophilicus* e *Bradyrhizobium* sp. e microbiolização separadamente com essas bactérias. Mesmo nos tratamentos em que houve inoculação do *S. rolfii* houve ganho nesse parâmetro, para os tratamentos que receberam as bactérias, quando comparado com o tratamento em que houve inoculação apenas de *S. rolfii*, esses aspectos foram preservados apenas para a massa seca de BRS Aracê. Já nas variedades Mercado, BRS Tumucumaque e BRS Xique-Xique houve ganho de massa fresca da raiz nos tratamentos que foram microbiolizadas com *Bradyrhizobium* sp. mesmo quando houve inoculação do patógeno, demonstrando que o efeito de *Bradyrhizobium* sp. manteve o estímulo do aumento da massa da raiz mesmo com a presença do patógeno (Figura 4).

Quanto a massa seca da raiz, temos comportamentos distintos para as seis variedades. Para a variedade Angelim houve maior massa para os tratamentos que receberam *Bradyrhizobium* sp., mesmo no que houve inoculação de *S. rolfii*. No tratamento em que foi inoculado o patógeno e recebeu microbiolização de *B. methylophilicus* também houve aumento da massa seca quando comparado ao tratamento controle e ao em que houve somente inoculação do patógeno. Para Manteguinha, houve aumento da massa seca somente no tratamento coinoculado com *B. methylophilicus* e *Bradyrhizobium* sp. Para Mercado e BRS Tumucumaque, houve aumento da massa seca somente no tratamento inoculado com *Bradyrhizobium* sp. Não houve tratamento maior que o controle para a BRS Xique-Xique (Figura 4).

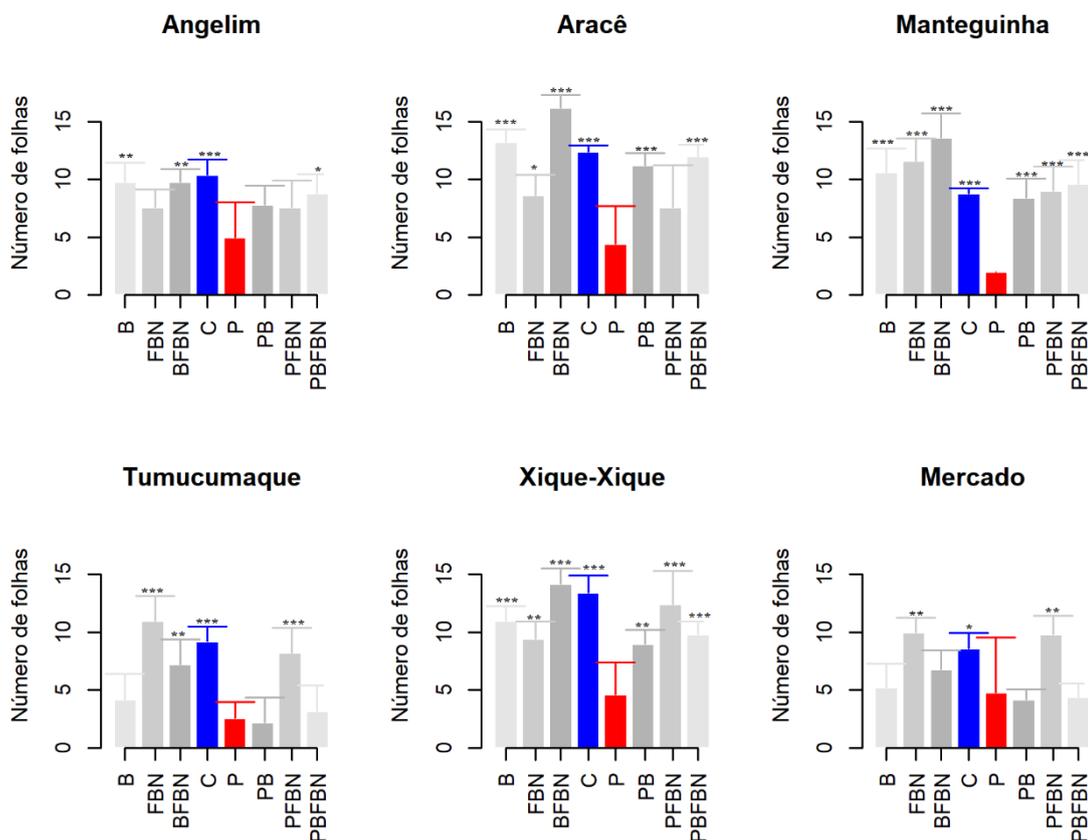
Figura 4: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PBFBN) na massa fresca e seca da raiz das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.



0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

O tratamento controle apresentou o maior número de folhas para a variedade Angelim. A variedade Mercado e BRS Tumucumaque apresentaram maior quantidade de folhas quando tratadas com *Bradyrhizobium* sp. BRS Xique-Xique e BRS Aracê tiveram mais folhas quando coinoculada com *B. methylophilicus* e *Bradyrhizobium* sp. Na variedade Manteguiinha os maiores números de folhas ocorreram nos tratamentos em que não houve inoculação do patógeno, que receberam *Bradyrhizobium* sp. *B. methylophilicus* de forma isolada, com maior número de folhas quando as bactérias foram utilizadas em coinoculação. Nessa variedade houve aumento no tratamento que recebeu interação das três variáveis (Patógeno, *B. methylophilicus* e *Bradyrhizobium* sp.) quando comparado ao tratamento controle (Figura 5).

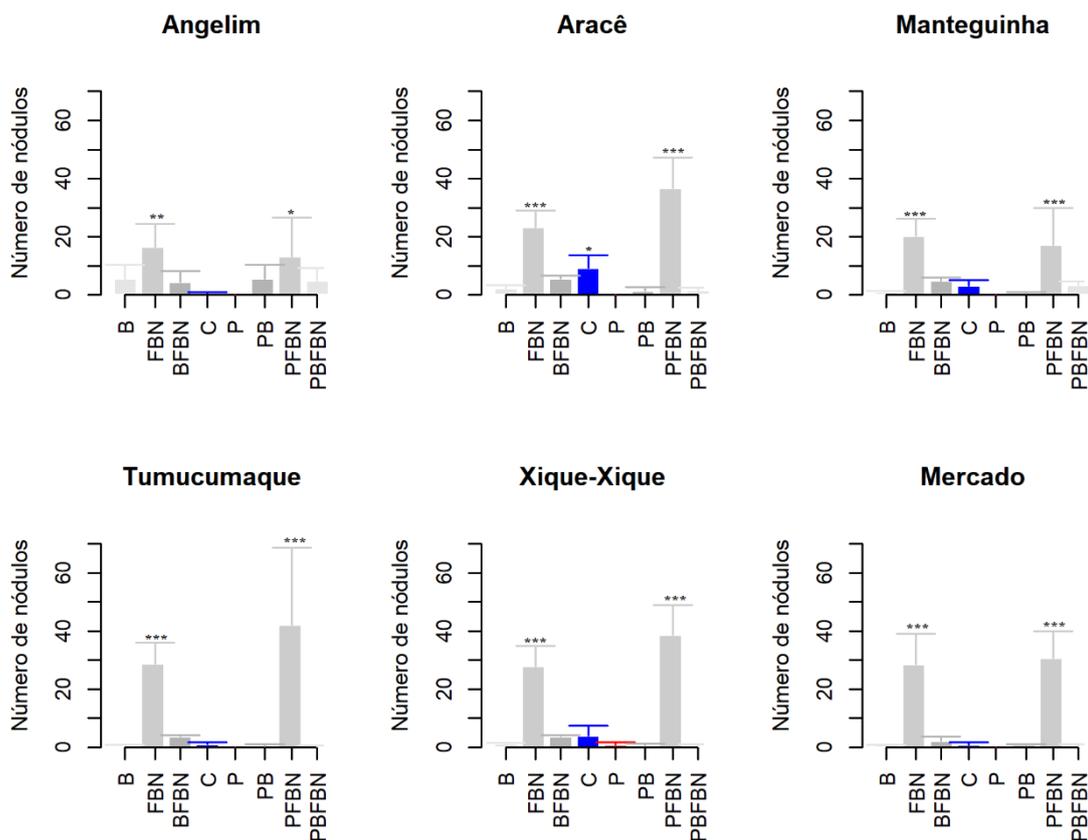
Figura 5: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylophilicus* (B); *Bacillus methylophilicus* inoculado com *Sclerotium rolfisii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfisii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylophilicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylophilicus* inoculado com *Sclerotium rolfisii* (PBFBN) no número de folhas das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.



0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Todos os tratamentos que receberam *Bradyrhizobium* sp. mesmo quando inoculados com *S. rolfsii* apresentaram maior quantidade de nódulos em todas as variedades (Figura 6).

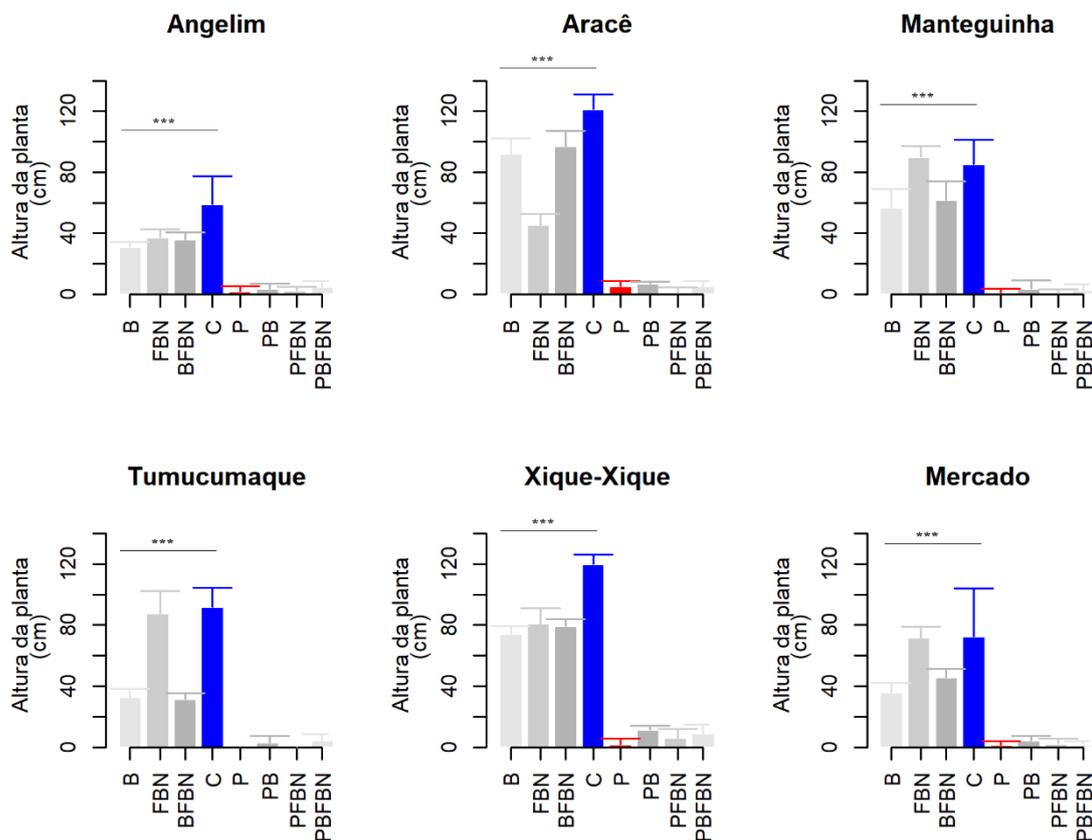
Figura 6: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Sclerotium rolfsii* (PBFBN) no número de nódulos das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.



0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

M. phaseolina demonstrou alta severidade afetando a germinação e causando morte de plantas durante a experimentação, portanto inviabilizou a verificação dos parâmetros aqui abordados, tornando alguns inexistentes. Em todos os tratamentos em que houve inoculação de *M. phaseolina* a altura das plantas foi prejudicada. Houve incremento da altura apenas no tratamento que recebeu *Bradyrhizobium* sp. na variedade Manteguiinha quando não inoculada com o patógeno. Nas demais variedades os tratamentos com as bactérias apresentaram crescimento inferiores ao tratamento controle (Figura 7).

Figura 7: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) na altura das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.



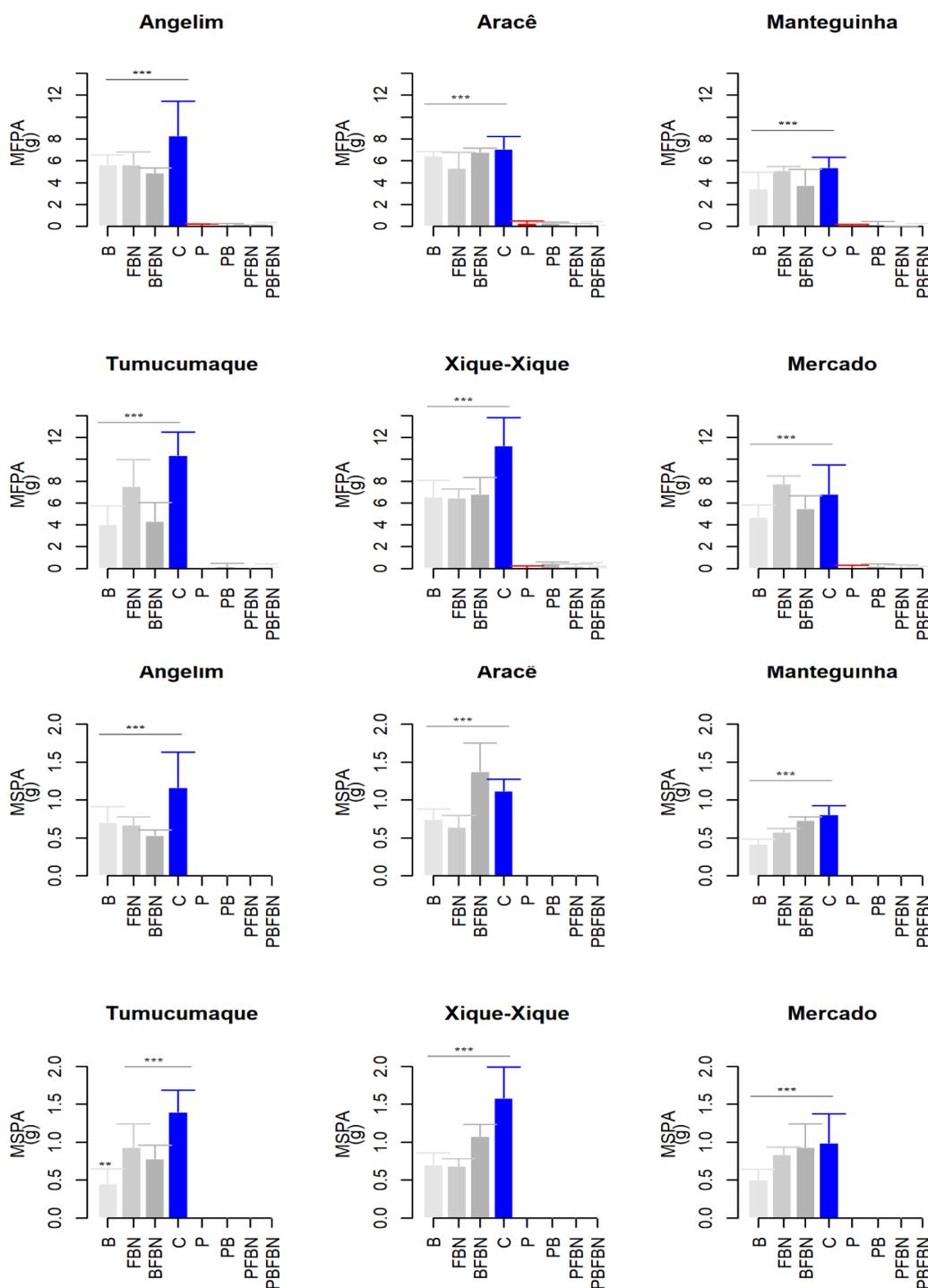
0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Nossos resultados discordam dos dados encontrados por Nelwamondo (2020) que observou um acréscimo da altura em plantas de feijão-caupi quando coinoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis*. Em nossos resultados para este parâmetro a

microbiolização apenas por *Bradyrhizobium* sp. foi responsável por esse incremento na variedade Manteguiinha.

Quanto a massa fresca e seca da parte aérea, em todos os tratamentos em que houve inoculação de *M. phaseolina* a massa das plantas foi reduzida. Houve incremento da massa apenas no tratamento que recebeu *Bradyrhizobium* sp. na variedade Mercado e para a cultivar BRS Aracê quando coinoculada com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. Nas demais variedades os tratamentos com as bactérias apresentaram crescimento inferiores ao tratamento controle (Figura 8).

Figura 8: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) na massa fresca e seca da parte aérea das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.

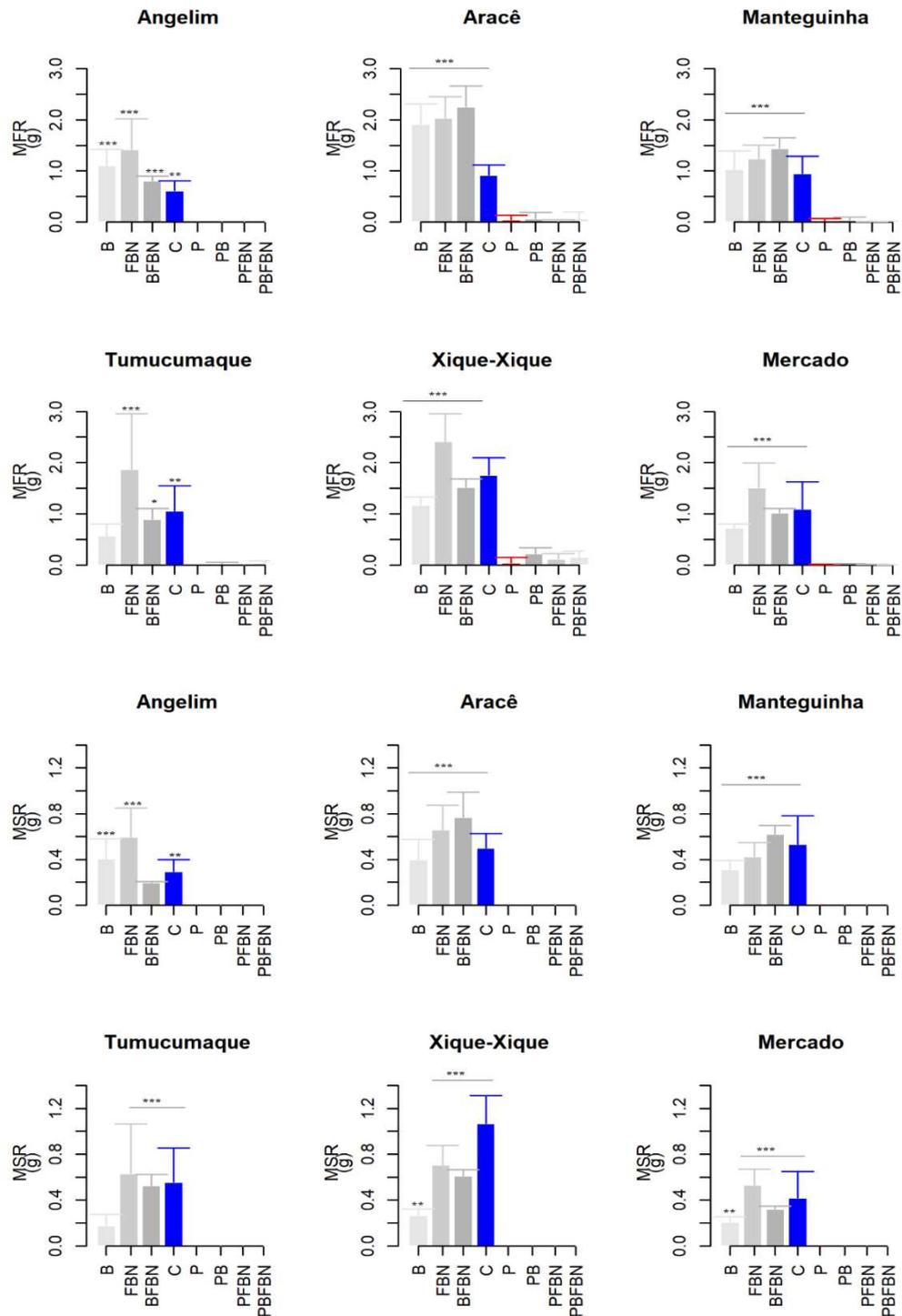


0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Quanto a massa fresca e seca da raiz, em todos os tratamentos em que houve inoculação de *M. phaseolina* a massa das plantas foi reduzida. Houve incremento da massa fresca da raiz para Angelim, Manteguinha e BRS Aracê quando coinoculadas e tratadas separadamente com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. Para BRS Tumucumaque, BRS Xique-Xique e Mercado houve acréscimo da massa fresca da raiz apenas para o tratamento que recebeu *Bradyrhizobium* sp. Para a massa seca da raiz Angelim, Mercado e BRS Tumucumaque apresentaram acréscimo dessa massa quando tratadas apenas com *Bradyrhizobium* sp. A variedade BRS Aracê quando microbiolizada *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. e isoladamente com *Bradyrhizobium* sp. Para Manteguinha a maior massa seca ocorreu no tratamento em que houve coinoculação de *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. Na variedade BRS Xique-Xique os tratamentos com as bactérias apresentaram crescimento inferiores ao tratamento controle (Figura 9).

Nossos resultados para as variedades Angelim, Manteguinha e BRS Aracê corroboram com os dados encontrados por Nelwamondo (2020) que observou um aumento biomassa em plantas de feijão-caupi quando coinoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis*.

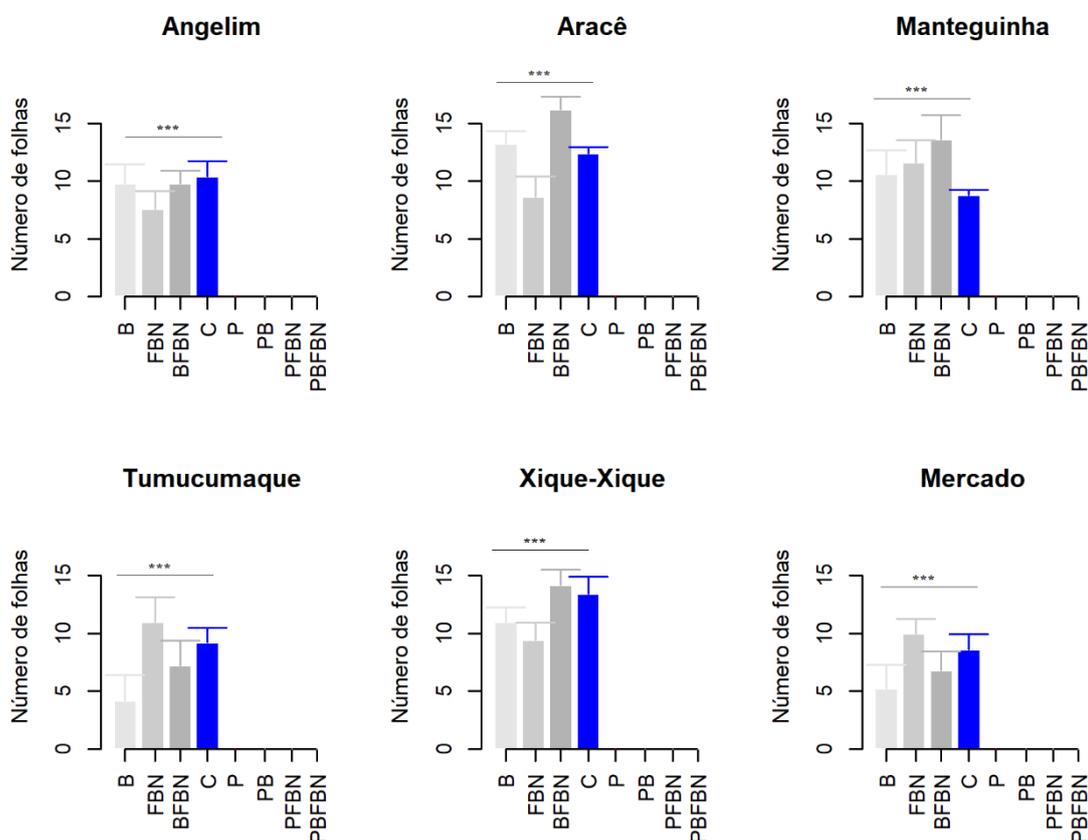
Figura 9: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) na massa fresca e seca da raiz das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.



0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Não houveram folhas em todos os tratamentos em que *M. phaseolina* foi inoculado, para todas as variedades. Na variedade Angelim os tratamentos com as bactérias apresentaram crescimento inferiores ao tratamento controle. BRS Tumucumaque e Mercado apresentaram maior número de folhas no tratamento que recebeu apenas *Bradyrhizobium* sp. BRS Aracê e BRS Xique-Xique apresentaram maiores números de folhas quando coinoculada com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. Já em Manteguinha o acréscimo ocorreu em todos os tratamento que foram coinoculados e tratados separadamente com *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. (Figura 10).

Figura 10: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) no número de folhas das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.

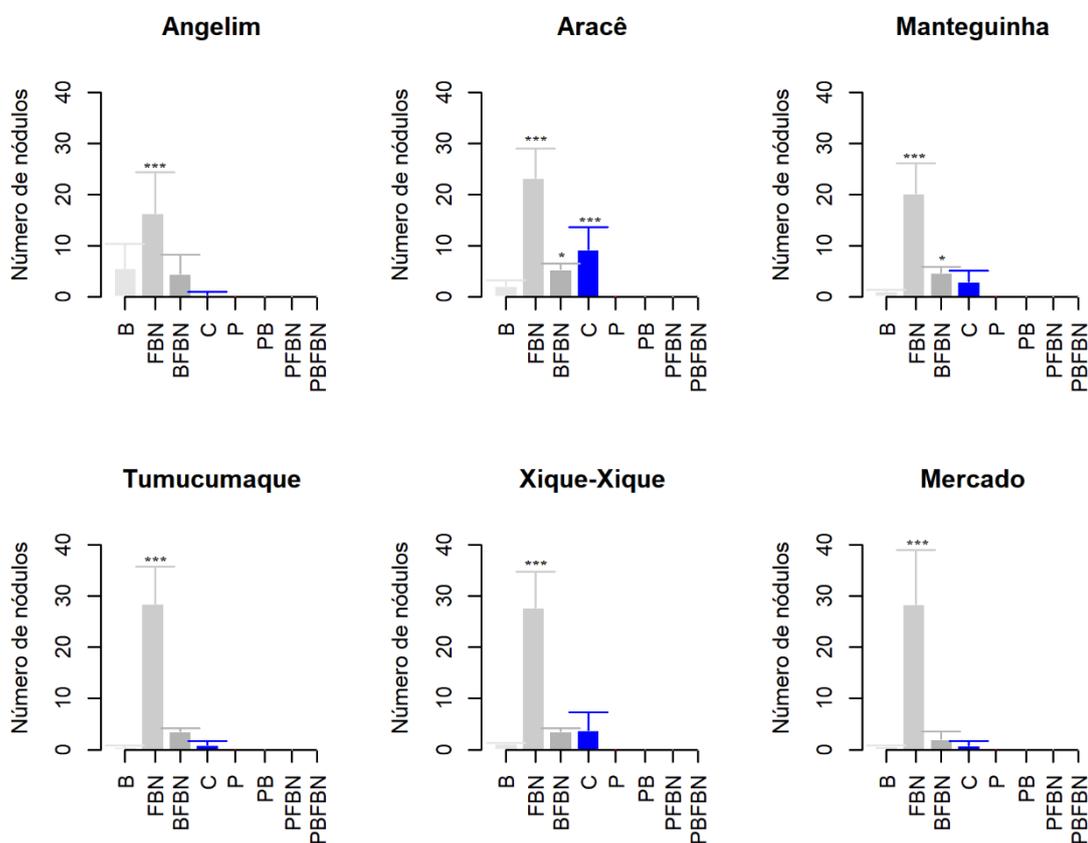


0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Nossos resultados para BRS Xique-Xique, BRS Aracê e Manteguiinha corroboram com os dados encontrados por Nelwamondo (2020) que observou um aumento do número de folhas em plantas de feijão-caupi quando coinoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis*. Em nossos resultados o incremento se deu para a variedade Manteguiinha mesmo com a inoculação do *S. rolf sii*, demonstrando preservar a promoção de crescimento mesmo diante de um parasitismo.

Não houveram nódulos em todos os tratamentos inoculados com *M. phaseolina*, para todas as variedades, devido a morte das plantulas logo após a germinação das sementes. Todas as variedades e cultivares demonstraram aumento de nódulos nos tratamento em que houve microbiolização apenas de *Bradyrhizobium* sp. (Figura 11).

Figura 11: Promoção do crescimento de variedades e cultivares de feijão caupi - Controle (C); Patógeno (P); *Bacillus methylotrophicus* (B); *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (BP); *Bradyrhizobium* sp. (FBN) e *Bradyrhizobium* sp. inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PFBN); *Bradyrhizobium* sp com *Bacillus methylotrophicus* (BFBN); *Bradyrhizobium* sp. com *Bacillus methylotrophicus* inoculado com *Macrophomina phaseolina* (PBFBN) no número de nódulos das plantas de cultivares tradicionais e biofortificadas.



0.05 *; 0.01 **; 0.001 ***. As médias foram comparadas por contraste, teste de comparações pareadas com o patógeno (Dunnett), As barras representam o desvio padrão.

Nelwamondo (2020) observou um aumento do número de nódulo em plantas de feijão-caupi quando coinoculadas com *Bradyrhizobium japonicum* e *Bacillus subtilis*. Em nossos resultados para este parâmetro o incremento se deu nos tratamentos em que houve a microbiolização apenas por *Bradyrhizobium* sp. em todas as cultivares, discordando dos resultados encontrado por esse autor. O incremento para tais parâmetros de crescimento podem ser explicados pelo potencial promotor de crescimento vegetal associados a espécies do gênero *Bradyrhizobium* sp. (SILAMBARASAN et al., 2022).

CONCLUSÃO

B. methylotrophicus inibiu o desenvolvimento de *S. rolfsii* e *M. phaseolina* *in vitro* e *in vivo* (casa-de-vegetação). *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. também apresentaram potencial biocontrolador para podridão-cinzenta quando coinoculadas. O efeito dessas rizobactérias sobre os parâmetros de crescimento são variáveis e provavelmente estão relacionados com as características de cada variedade, cultivar e patossistema.

REFERÊNCIAS

- ABAWI, G. S.; PASTOR CORRALES, M. A. **Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies, and management strategies.** CIAT, Cali, Colombia. 1990. 114p.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil. In: BASTOS, E. A. **A cultura do feijão-caupi no Brasil.** 1 ed. Brasília: Embrapa Meio-Norte, 2016.
- BOJÓRQUEZ-ARMENTA, Y. J. et al. Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. **Journal of General Plant Pathology**, v. 87, n. 6, p. 377-386, 2021.
- FIGUEREDO, M. S.; TONELLI, M. L.; IBÁÑEZ, F.; MORLA, F.; CERIONI, G.; DEL CARMEN TORDABLE, M.; FABRA, A. Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co-inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. **Microbiological research**, v. 197, p. 65-73, 2017.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios.** 1 ed. Teresina: Embrapa Meio- Norte, 2011. 84 p.
- GONIEM, K. E.; BELAL, E. B. Biocontrol of some cowpea soil-borne diseases and its relation to nitrogen fixing bacteria (*Bradyrhizobium* sp.). **J. Agric. Res. Kafrelsheikh Univ**, v. 39, n. 3, p. 277-305, 2013.
- GU, Q.; et al. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Applied and environmental microbiology**, v. 83, n. 19, p. e01075-17, 2017.
- KUMAR, Sumit et al. Cyclic siloxane biosurfactant-producing *Bacillus cereus* BS14 biocontrols charcoal rot pathogen *Macrophomina phaseolina* and induces growth promotion in *Vigna mungo* L. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 8, p. 5043-5054, 2021.
- MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Identificação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R.; Silveira, E. B. (Eds.) **Manual de práticas em Fitobacteriologia.** 2a Ed. Recife PE. Universidade Federal Rural de Pernambuco. pp. 67-109. 2005.

- MCKINNEY, H.H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, n.5, p.195-218, 1923.
- MENTEN, J. O. M. et al. Efeito de alguns fungicidas no crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* (Tass.) Goid. “*in vitro*”. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. 1, n. 2, p. 57-66, 1976.
- MICHEREFF, S. J. et al. **Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais**. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds.). *Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais*. 1. ed. Recife, PE: UFRPE - Imprensa Universitária, 2005. p. 1–18.
- NELWAMONDO, A. M. **Assesment of co-inoculation of bradyrhizobium japonicum and bacillus subtilis on yield and metabolic profile of bambara groundnut and cowpea under glasshouse conditions**. 80 p. Master of science. University of South African (UNISA). 2020.
- PÉREZ-GARCÍA, Alejandro; ROMERO, Diego; DE VICENTE, Antonio. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current opinion in biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.
- ROCHA, D. J. A.; CORRÊA, B.O.; BUSS, R.B.; MOURA, A.B. **Avaliação do potencial de rizobactérias para o biocontrole de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* agente da murcha bacteriana do feijão**. CIC XI EPOS I Mostra Científica. Disponível em: [http:// ww.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01571.pdf](http://ww.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CA/CA_01571.pdf). Acesso em 10 de novembro de 2019.
- ROMANO, A.; VITULLO, D.; SENATORE, M.; LIMA, G.; LANZOTTI, V. Antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain BO5A. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 11, p. 2019-2025, 2013.
- SHAHID, Izzah et al. Profiling of metabolites of *Bacillus* spp. and their application in sustainable plant growth promotion and biocontrol. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 605195, 2021.
- SHARMA C.K.; VISHNOI, V. K.; DUBEY, R. C.; MAHESHWARI D. K. A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. **Rhizosphere**, 5:71–75. .2018.

SILAMBARASAN, S.; LOGESWARI, P.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; CORNEJO, P., SIPAHUTAR, M. K.; PUGAZHENDHI, A. Amelioration of aluminum phytotoxicity in *Solanum lycopersicum* by co-inoculation of plant growth promoting *Kosakonia radicincitans* strain CABV2 and *Streptomyces corchorusii* strain CASL5. **Science of The Total Environment**, 832, 154935. 2022.

SONGA, W.; HILLOCKS, R.J.; MWANGO'MBE, A. W.; BURUCHARA, R.; RONNO, W. K. Screening common bean accessions for resistance to charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in eastern Kenya. **Experimental Agriculture**, v.33, p.459-468, 1997.

YADAV, K. et al. Effective biocontrol of banana fusarium wilt tropical race 4 by a bacillus rhizobacteria strain with antagonistic secondary metabolites. **Rhizosphere**, v. 18, p. 100341, 2021.

ZILLI, J.É.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. **BR 3262**: nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima. Boa Vista: Embrapa Roraima, 2008. 7p. (Embrapa Roraima. Comunicado técnico, 10).

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos nessa pesquisa, podemos afirmar que nossa hipótese foi aceita a considerar as conclusões a seguir.

Quanto a qualidade fisiológica e sanitária das sementes de feijão- caupi todas as variedades e cultivares apresentaram altos valores de germinação e vigor. O teor de água presente nas sementes das variedades encontram-se dentro dos padrões, exceto para a cultivar BRS Tumucumaque, porém não houve prejuízo ao seu potencial fisiológico. O maior número de contaminantes encontrados nessa variedade provavelmente está relacionado ao elevado teor de água presente nas sementes.

Nossos resultados indicam o potencial biocontrolador de *B. methylotrophicus* tanto *in vitro* como *in vivo* (casa-de-vegetação) para a *F. oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*. A microbiolização de sementes com *Bradyrhizobium* sp. proporcionou aumento na altura das plantas, número de folhas, comprimento da raiz e número de nódulos, para Angelim e BRS Tumucumaque.

B. methylotrophicus teve efeito antagonista *in vitro* e *in vivo* para *S. rolfsii* e *M. phaseolina*. *Bradyrhizobium* sp. proporcionou redução da incidência para murcha de esclerócio e um melhor potencial de controle para *M. phaseolina*. Essas rizobactérias também apresentaram potencial biocontrolador para a doença quando coinoculadas.

A aplicação de *B. methylotrophicus* e *Bradyrhizobium* sp. confere uma alternativa importante para a sustentabilidade agrícola e ambiental no manejo dos sistemas produtivos de feijão-caupi. Estudos posteriores, devem avaliar a eficácia desses métodos para pesquisas realizados em campo, aproximando tais tecnologias de manejo do produtor.

ANEXOS

ANEXO 1

ANEXO 1: Normas das revistas



PREPARO DO MANUSCRITO

- **Digitação:** o texto deve ser composto em programa Word (DOC) ou compatível e os gráficos em programas compatíveis com o Windows, como Excel, e formato de imagens: Figuras (GIF) e Fotos (JPEG). Deve ter no máximo 20 páginas, tamanho A4, digitado com espaçamento 1,5, fonte Times New Roman, estilo normal, tamanho 12 e parágrafo recuado por 1 cm. Todas as margens deverão ter 2,5 cm. Páginas e linhas devem ser numeradas; os números de páginas devem ser colocados na margem inferior, à direita e as linhas numeradas de forma contínua. Se forem necessárias outras orientações, entre em contato com o Comitê Editorial.
- **Tamanho:** o manuscrito não deverá ultrapassar 2,0 MB.
- **Organização:** o artigo científico deverá ser organizado em título, nome do(s) autor(es), resumo, palavras-chave, título em inglês, abstract, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos (opcional), e referências.

Observação: As NOTAS TÉCNICAS devem apresentar até 12 páginas, incluindo tabelas e figuras.

Título: deve ser escrito em maiúsculo, negrito, centralizado na página, no **máximo com 15 palavras**, não deve ter subtítulo e abreviações. O nome científico deve ser indicado no título apenas se a espécie for desconhecida. Os títulos das demais seções da estrutura (resumo, abstract, introdução, material e métodos, resultados e discussão, conclusão, agradecimentos e referências) deverão ser escritos em letra maiúscula, negrito e justificado à esquerda.

Autores(es): nomes completos, sem abreviaturas, em letra maiúscula, um após o outro, separados por vírgula e centralizados. Essas informações deverão constar apenas na versão final do artigo. **Na primeira versão do artigo submetido, os nomes dos autores e a nota de rodapé com os endereços deverão ser omitidos.**

Para a inclusão do(s) nome(s) do(s) autor(es) e do(s) endereço(s) na **versão final do artigo** deve-se, como nota de rodapé na primeira página, indicar, para cada autor, afiliação completa (Unidade/Setor, Instituição, Cidade, Estado, País), endereço completo e e-mail de todos os autores. O autor correspondente deverá ser indicado por um “*”.

No rodapé devem constar informações sobre a natureza do trabalho (se extraído de tese/dissertação) e referências às instituições colaboradoras. Exemplo:

*Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em xx/xx/xxxx ; aceito em xx/xx/xxxx.

Especificação (natureza) do trabalho. (se extraído de tese/dissertação)

²Unidade/Setor (por extenso), Instituição (por extenso e sem siglas), Cidade, Estado(sigla), País; E-mail (s) – ORCID.

Exemplo:

²Department of Plant Sciences, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil; analucia-dossantos@hotmail.com – ORCID: 0000-0002-5837-0544.

OBS.: Caso dois ou mais autores tenham as mesmas especificações, não precisa repetir as informações, basta acrescentar, apenas, o e-mail e o ORCID ao final.

Só serão aceitos, no máximo, 5(cinco) autores por artigo submetido: ressaltamos que, salvo algumas condições especiais, poderá ser incluído um sexto autor (não mais que isso) mediante apresentação de justificativas. A justificativa deverá ser anexada, no ato da submissão, em “Documentos Suplementares”, para que o Comitê Editorial proceda com a devida análise. Caso isso não ocorra, a submissão de artigo com número superior a 5 (cinco) autores não será aceita.

** Não serão permitidas mudanças nos nomes de autores *a posteriori*.

** Todos os autores deverão, OBRIGATORIAMENTE, cadastrarem-se no sistema.

Resumo e Abstract: no mínimo 100 e no máximo 250 palavras.

Palavras-chave e Keywords: a primeira letra maiúscula. Devem ter, no mínimo, três e, no máximo, cinco palavras, não constantes no Título/Title e separadas por ponto (consultar modelo de artigo).

Obs.: Em se tratando de artigo escrito em idioma estrangeiro (Inglês), o título, resumo e palavras-chave deverão, também, constar em Português, mas com a sequência alterada, vindo primeiro no idioma estrangeiro.

Introdução: no máximo, **550 palavras**, contendo citações atuais que apresentem relação com o assunto abordado na pesquisa.

Conclusão: deve ser em texto corrido, sem tópicos.

Agradecimentos: logo após as conclusões, poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições, indicando, de forma clara, as razões pelas quais os faz.

Tabelas: sempre **com orientação em “retrato”**, fonte **Times New Roman, estilo normal, tamanho 12**. Serão numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na parte superior. **Não usar linhas verticais**. As linhas horizontais devem ser usadas para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma no final da tabela. Cada dado deve ocupar uma célula distinta. Não usar negrito ou letra maiúscula no cabeçalho. Recomenda-se que **as tabelas apresentem 8,2 cm de largura, não ultrapassando 17 cm**.

Obs.: Os números nunca são separados por vírgulas, sempre por pontos.

Ex.:

FPE ⁽¹⁾	N	Min	Max	Average	SD	CV(%)	ASS ⁽¹⁾	KT ⁽²⁾	LT ⁽³⁾
Canola extract – batch 1									
Test	25	20.13	34.66	26.48	4.40	16.6	0.371 ^m	1.940 ^m	0.235*
E.Aq	25	0.50	22.50	8.98	6.66	74.2	0.390 ^m	2.249 ^m	0.241*

Figuras: sempre **com orientação em “retrato”**. Gráficos, fotografias ou desenhos levarão a denominação geral de **Figura** sucedida de numeração arábica crescente e legenda na parte inferior. Para a preparação dos gráficos deve-se utilizar “softwares” compatíveis com

“Microsoft Windows”. A resolução deve ter qualidade máxima com pelo menos 300 dpi. **As figuras devem apresentar 8,5 cm de largura, não ultrapassando 17 cm.** A fonte empregada deve ser a Times New Roman, corpo 10 e não usar negrito na identificação dos eixos. As linhas dos eixos devem apresentar uma espessura de 1,5 mm de cor preta. A Revista Caatinga reserva-se ao direito de não aceitar tabelas e/ou figuras com ORIENTAÇÃO na forma “paisagem” ou que apresentem mais de 17 cm de largura. **Tabelas e Figuras devem ser inseridas logo após a sua primeira citação.**

Atenção: Na etapa da prova tipográfica, se houver a necessidade de correções de figuras, o autor correspondente deverá fazer as alterações e enviar para a Revista Caatinga.

- **Equações:** devem ser digitadas usando o editor de equações do Word, com a fonte Times New Roman. As equações devem receber uma numeração arábica crescente. As equações devem apresentar o seguinte padrão de tamanho:

Inteiro = 12 pt

Subscrito/sobrescrito = 8 pt

Sub-subscrito/sobrescrito = 5 pt

Símbolo = 18 pt

Subsímbolo = 14 pt

Estas definições são encontradas no editor de equação no Word.

REFERÊNCIAS

Devem ser digitadas em espaço 1,5 cm e separadas entre si pelo mesmo espaço (1,5 cm).

Precisam ser apresentadas em ordem alfabética de autores; justificar (Ctrl + J). Este periódico utiliza a **NBR 6023 de agosto/2002 da ABNT. UM PERCENTUAL DE 70% DO TOTAL DAS REFERÊNCIAS DEVERÁ SER ORIUNDO DE PERIÓDICOS CIENTÍFICOS INDEXADOS COM DATA DE PUBLICAÇÃO INFERIOR A 10 ANOS.**

O título do periódico não deve ser abreviado e recomenda-se um total de 20 a 30 referências.

EVITE CITAR RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS E PUBLICADOS EM CONGRESSOS E SIMILARES.

Citações de autores no texto: devem ser observadas as normas da ABNT, NBR 10520 de agosto/2002.

Ex: Com 1(um) autor, usar Torres (2008) ou (TORRES, 2008); com 2 (dois) autores, usar Torres e Marcos Filho (2002) ou (TORRES; MARCOS FILHO, 2002); com 3 (três) autores, usar França, Del Grossi e Marques (2009) ou (FRANÇA; DEL GROSSI; MARQUES, 2009); com mais de três, usar Torres et al. (2002) ou (TORRES et al., 2002).

REGRAS DE CITAÇÕES DE AUTORES

**** Até 3 (três) autores**

Mencionam-se todos os nomes, na ordem em que aparecem na publicação, separados por ponto e vírgula.

Ex: TORRES, S. B.; PAIVA, E. P. PEDRO, A. R. Teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de jiló. **Revista Caatinga**, volume: páginas, ano.

**** Acima de 3 (três) autores**

Menciona-se apenas o primeiro nome, acrescentando-se a expressão **et al.**

Ex: BAKKE, I. A. et al. Water and sodium chloride effects on *Mimosa tenuiflora* (Willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**, 19: 261-267, 2006.

**** Grau de parentesco**

HOLANDA NETO, J. P. **Método de enxertia em cajueiro-anão-precoce sob condições de campo em Mossoró-RN**. 1995. 26 f. Monografia (Graduação em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura de Mossoró, Mossoró, 1995.

COSTA SOBRINHO, João da Silva. Cultura do melão. **Cuiabá**: Prefeitura de Cuiabá, 2005.

MODELOS DE REFERÊNCIAS

A) ARTIGOS DE PERIÓDICOS

AUTOR (acima de 3 autores utilizar et al.). Título do artigo. **Nome do periódico**, volume, páginas inicial-final, ano.

Exemplos:

RIBEIRO, R. M. P. et al. Dinâmica do crescimento de cultivares de gergelim. **Revista Caatinga**, 31: 1062-1068, 2018.

* **Obs.: Se não tiver volume colocar s/v.**

RIBEIRO, R. M. P. et al. Dinâmica do crescimento de cultivares de gergelim. **Revista Caatinga**, s/v.: 1062-1068, 2018.

B) LIVROS, FOLHETOS, COLEÇÃO E BOLETIM, NO TODO

AUTORES (acima de 3 autores utilizar et al.). **Título**: subtítulo (se houver). Edição (se houver). Local (cidade) de publicação: Editora, ano. Número de páginas ou volumes. (nome e número da série quando se tratar de folhetos)

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2004**. 1. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2003. 237 p.

Ex: RESENDE, M. et al. **Pedologia**: base para distinção de ambientes. 2. ed. Viçosa: NEPUT, 1997. 367 p.

OLIVEIRA, A. I.; LEONARDOS, O. H. **Geologia do Brasil**. 3. ed. Mossoró: ESAM, 1978. 813 p. (Coleção mossoroense, 72).

MELO FILHO, H. F. R.; SILVA, F. B. R.; JACOMINE, P. K. T. **Levantamento detalhado dos solos da Fazenda**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 1982. 59 p. (Boletim Técnico,78).

RIBEIRO, F. E. et al. **O coqueiro-anão no Brasil**. Aracaju: EMBRAPA, 1999. 22 p. (Documentos, 8).

C) LIVROS OU FOLHETOS, EM PARTE (CAPÍTULO DE LIVRO)

AUTOR DO CAPÍTULO (acima de 3 autores utilizar et al.). Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO (acima de 3 editores utilizar et al.). (Ed. ou Eds.) **Título**: subtítulo do livro (se

houver). Número de edição (se houver). Local de publicação (cidade e Estado): Editora, ano. Indicação de volume, capítulo, páginas inicial-final do capítulo.

*Ed. (quando é somente 1 autor);

*Eds. (mais de um autor).

Ex: BALMER, E.; PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E. (Ed.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

BALMER, E. et al. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E. et al. (Eds.). **Melhoramento e produção do milho**. Campinas, SP: Fundação Cargill, 1987. v. 2, cap. 14, p. 595-634.

D) DISSERTAÇÕES E TESES (somente serão permitidas citações recentes, PUBLICADAS NOS ÚLTIMOS TRÊS ANOS QUE ANTECEDEM A REDAÇÃO DO ARTIGO). Referenciam-se da seguinte maneira:

AUTOR. **Título**: subtítulo (se houver). Ano de apresentação. Número de folhas ou volumes. Categoria (grau: e área de concentração) – Nome da Instituição sem abreviaturas ou sigla, local, ano.

Ex: OLIVEIRA, F. N. **Avaliação do potencial fisiológico de sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.)**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia: Área de Concentração em Tecnologia de Sementes) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2011.

E) ARTIGOS DE ANAIS/PROCEEDINGS OU RESUMOS (DEVEM SER EVITADOS)

AUTOR (acima de 3 autores utilizar et al). Título. In: NOME DO CONGRESSO, nº ., ano, local de realização (cidade). **Anais...** Local de publicação (cidade): Editora, data de publicação. Número de páginas ou volumes.

ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA-CNPQ, 1997. v. 1, p. 300-304.

INDULSKA, J.; KERRY, R. Distributed Applications and Interoperable Systems: In: 7TH IFIP WG 6.1 INTERNATIONAL CONFERENCE, 2007, Paphos. **Proceedings...** Paphos: Springer, 2007, Vol. 4531.

MENEZES, M. Avaliação de espécies de *Trichoderma* no tratamento de feijão e do solo, visando o controle de *Macrophomina phaseolina*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, nº. 25., 1992, Gramado, RS. **Anais...** Brasília: SBS, 1992. p. 159.

Ex: BALLONI, A. E.; KAGEYAMA, P. Y.; CORRADINI, I. Efeito do tamanho da semente de *Eucalyptus grandis* sobre o vigor das mudas no viveiro e no campo. In: CONGRESSO FLORESTAL BRASILEIRO, nº. 3., 1978, Manaus. **Anais...** Manaus: UFAM, 1978. p. 41-43.

JÖNK, M. W. et al. Estudo de meio de cultura para *Bacillus subtilis* CCT516 utilizando técnica de planejamento experimental. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, nº. 20., 2014, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: COBEC, 2014. p. 1-8.

***Se for em cd:**

GUNCHO, M. R. A educação à distância e a biblioteca universitária. In: SEMINÁRIO DE BIBLIOTECAS UNIVERSITÁRIAS, nº. 10., 1998, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Tec Treina, 1998. 1 CD-ROM.

F) LITERATURA CUJA AUTORIA É UMA OU MAIS PESSOAS JURÍDICAS

Exemplos:

Se tiver editora:

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6023:** informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

Se não tiver editora:

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2004.** 1. ed. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2003. 237 p.

G) EM MEIO ELETRÔNICO - Os documentos /informações de **acesso exclusivo por computador** (online) compõem-se dos seguintes elementos essenciais para sua referência:

AUTOR. **Denominação ou título:** subtítulo (se houver) do serviço ou produto, indicação de responsabilidade. Ano (se houver). Endereço eletrônico entre os sinais < > precedido da expressão – Disponível em: – e a data de acesso precedida da expressão – Acesso em:

Exemplos:

BRASIL. Ministério da Agricultura e do abastecimento. **SNPC – Lista de Cultivares protegidas.** Disponível em: <<http://agricultura.gov.br/scpn/list/200.htm>>. Acesso em: 08 set. 2008.

GOULART A. M. C. **Aspectos gerais sobre os nematoides-das-lesões-radiculares, (gênero *Pratylenchus*).** 2008. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/571924/1/doc219.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal.** Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 mar. 2019.

H) FOTOS

Referência de fotógrafo.

Exemplo: NOME DO FOTÓGRAFO. (Fotógrafo). Ano. Título do trabalho em negrito. Cidade e Estado, data com dia, mês e ano. Fotografia.

SANTOS, A. L. S. (Fotógrafo). 2020. **Dinâmica do crescimento de cultivares de gergelim.** Mossoró/RN, 24 ago. 2020. Fotografia.

UNIDADES E SÍMBOLOS DO SISTEMA INTERNACIONAL ADOTADOS PELA REVISTA CAATINGA

Números mencionados em sequência devem ser separados por **ponto e vírgula (;)**. Ex: 2,5; 4,8; 5,3

**TABLE OF CONTENTS**

•	Description	p.1
•	Audience	p.2
•	Impact Factor	p.2
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4

**Introduction**

Biological Control promotes the science and technology of biological control through publication of original research articles and reviews of research and theory. The focus includes new and emerging trends in this field. Biological control is defined as the reduction or mitigation of pests and pest effects through the use of natural enemies. Biotechnologies dealing with the elucidation and use of genes or gene products for the enhancement of biological control agents are also of interest.

The journal encompasses biological control of viral, microbial, nematode, insect, mite, weed, and other invertebrate and vertebrate pests in agricultural, aquatic, forest, natural resource, stored products, and urban environments. Biological control of arthropod pests of human and domestic animals is also included. Ecological, behavioral, molecular, and biotechnological approaches to advancing the understanding of biological control agents are welcome.

The "rules of 6"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 6" for publishing in BCON. We have produced six clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here](#).

Types of paper

The following types of original papers only will be considered.

Regular research papers are hypothesis-driven projects in biological control as defined above under the "Subject areas of the journal". These papers constitute the majority of the articles published in the journal. However, papers which report on routine results of host specificity studies on new biological control agents, surveys for known or unknown biological control agents, or screening of natural enemies against a pest species will not be considered for publication unless the account describes unusual circumstances or novel methods, or unless the study is placed in a broader perspective. Research papers should have the following sections: a brief Abstract that contains a concise statement of the results obtained; Keywords listed immediately after the Abstract; Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion; Acknowledgments; and References. Further details are provided below under "Preparation of manuscript".

Perspectives papers provide the authors with a forum for discussing topics and trends in biological control. These articles should raise interesting or unanswered questions, present arguments about the significance of recent findings, describe the application and limitations of new methods and technologies, or consider potential interfaces between biological control and other disciplines in the sciences. These manuscripts should include the format as listed for the **Regular research papers** or may deviate by having the following sections: Abstract, Introduction, appropriate headings, Conclusion, and References.

Review articles are intended to reach a broad audience of readers from investigators in the field to new graduate students learning the material for the first time. Review articles are subject to the same review process as original papers. Manuscripts should be prepared according to the general guidelines given below. The Materials and Methods, Results, and Discussion sections may be replaced with appropriate alternatives; an Abstract is still required. The editors invite inquiries and suggestions for timely and provocative review articles. In some cases, there may be a number of review articles (e.g., a symposium topic) in which case a special issue of the journal may be published. The special issue may include an invited "editor(s)" who invites the authors and selects the topics, provides the guidelines to the authors, sets deadlines, etc., and submits the manuscripts to the journal. The journal editor then handles the manuscripts following normal protocols.

Biological Control does not publish Short Communications or Research Notes.

Contact details for submission

Manuscripts should be written in grammatically correct English and should be submitted through the Web site at <https://www.editorialmanager.com/bcon/default.aspx>.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Revised Submission

Please follow the [Checklist for submission of revised manuscript](#) for submitting the revised files.



Before You Begin

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Policy and ethics

Ethics. Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright holder. Written authorization may be required at the discretion of the editors. Articles and any other material published in *Biological Control* represent the opinions of the authors and should not be construed to reflect the opinions of the editors or the publisher.

A submitted paper will be considered in violation of Elsevier's Ethics Guidelines, and thus potentially subject to rejection or retraction, in the event of the following: the study results are inaccurately or deceptively reported, the data from the study results cannot be produced, the paper submitted is not an original work or it has plagiarized (by copying or paraphrasing) another work, the paper has been submitted concurrently to another journal or is elsewhere published, other works discussed in the paper are improperly cited or un-cited, the list of co-authors is incomplete or contains those who have not contributed substantially to the work, any experiments involving human or animal subjects or hazardous chemicals are not ensured in the paper as having been conducted according to the appropriate guidelines, or financial or otherwise conflicts of interest are not disclosed. For a comprehensive explanation of Elsevier's Ethics Guidelines, please visit <https://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Should questions of probity arise under extraordinary and controversial situations, the editors will reserve the right to subject the authors' data to independent scientific evaluation.

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a Journal Publishing Agreement. (for more information on this and copyright see <https://www.elsevier.com/copyright>).

Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript

together with a "Journal Publishing Agreement" form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note

that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers

the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.



Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our Support Center.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section

numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any

future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Consult the latest edition of the CBE Style Manual, Council of Biology Editors, Inc., for standard abbreviations, names, and symbols for units, as well as for informative suggestions about grammar, style, and usage. Nonstandard abbreviations should be minimal and should be defined at first mention. Follow the latest edition of "Webster's New International Dictionary" for spelling and division of words. Use numerals with standard units of measurement and for any number above nine. For the sake of consistency, the journal will use U.S. English. Manuscripts should be typed with the language set to U.S. English.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry for further information.

For organisms, the complete taxonomic name including the authority must be given at first mention in the text. For exceptions to this rule, such as names of bacteria, consult the editor. The names of insects will be in accordance with the Entomological Society of America. Wherever a common name for a pesticide exists, it should be used. The chemical name of the pesticide must be included in parentheses following the first mention of the common name. Most common names may be found in Guide to the Chemicals Used in Crop Protection by E.Y. Spencer, Agriculture Canada, 7th ed., 1982, and more recent entries are found in The Pesticide Manual-A World Compendium (C.R. Worthington, Ed.; S.B. Walker, Asst. Ed.), 8th ed., British Crop Protection Council, Binfield, Bracknell, Berks RG 125QE, England. In addition, common names of insecticides are listed from time to time by the Entomological Society of America; of herbicides, by the Weed Science Society of America; and of fungicides, by the American Phytopathological Society. For weed names, use the terminology approved by the Weed Science Society of America [Weed Science 32 (Suppl. 2), 1-137, 1984]. For enzymes, the systematic name and number given by the Enzyme Commission (EC) should be included at the first point of mention for each enzyme of importance in the paper. For EC numbers, consult Recommendations (1984) of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry, 1984, Enzyme Nomenclature, Academic Press

Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine.

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;

- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions on separate page(s) at the end of the manuscript. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Supply table captions on separate page(s) at the end at the end of the manuscript. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*,

<https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Social Media

If your article is Accepted, we may promote your article on Elsevier's Twitter feed [@ParasitologyELS](https://twitter.com/ParasitologyELS). If you wish your article to be considered for promotion, please supply a short Tweet text that succinctly highlights the key research findings, and 2 or 3 hashtags. Please also include your own Twitter handle. You may also wish to include an image to accompany the Tweet (ideally 1200 x 675 pixel dimensions). For further promotion

of your article we encourage you to tag [@ParasitologyELS](#) in any of your own Tweets of your accepted paper for greater dissemination.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in Research Elements.

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a Research Elements article.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



After Acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).