

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA - UFU
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - ICIAG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DAHÍS RAMALHO MOURA

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA QUANTO A RESISTÊNCIA A *Xanthomonas*
axonopodis pv. *glycines* E *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

UBERLÂNDIA- MINAS GERAIS
2021

DAHÍS RAMALHO MOURA

REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA QUANTO A RESISTÊNCIA A *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* E *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia – Doutorado, área de concentração em Fitotecnia, para obtenção do título de “Doutora em Agronomia”.

Área de concentração: Produção Vegetal

Orientador

Prof. Dr. Fernando Cezar Juliatti

Co-orientadora

Prof. Dra. Nilvanira Donizete Tebaldi

UBERLÂNDIA - MINAS GERAIS

2021

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M929 2021	<p>Moura, Dahís Ramalho, 1992- REAÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA QUANTO A RESISTÊNCIA A Xanthomonas axonopodis pv. glycines E Pseudomonas savastanoi pv. glycinea [recurso eletrônico] / Dahís Ramalho Moura. - 2021.</p> <p>Orientadora: Fernando Cezar Juliatti . Coorientadora: Nilvanira Donizete Tebaldi. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Agronomia. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.160 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Agronomia. I. , Fernando Cezar Juliatti, 1957-, (Orient.). II. Tebaldi, Nilvanira Donizete, 1970-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Agronomia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 631</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 206 - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6715/6716 - www.ppga.iciag.ufu.br - posagro@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Agronomia				
Defesa de:	Tese; 004/2021; PPGAGRO				
Data:	Quatro de março de dois mil e vinte e um	Hora de início:	08:00	Hora de encerramento:	12:28
Matrícula do Discente:	11713AGR006				
Nome do Discente:	Dahís Ramalho Moura				
Título do Trabalho:	Reação de genótipos de soja quanto a resistência a <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> e <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>				
Área de concentração:	Fitopatologia				
Linha de pesquisa:	Controle e Manejo Integrado de Doenças				

Reuniu-se por videoconferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Agronomia, assim composta: Professores Doutores: Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU; Osvaldo Toshiyuki Hamawaki - UFU; Fábio Janoni Carvalho - IFTM; Daiane Marques Duarte - Pesquisadora; Fernando Cezar Juliatti - UFU orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Fernando Cezar Juliatti, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



§ 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nilvanira Donizete Tebaldi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 04/03/2021, às 12:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fábio Janoni Carvalho, Usuário Externo**, em 05/03/2021, às 10:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daiane Marques Duarte, Usuário Externo**, em 05/03/2021, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Oswaldo Tosiuyuki Hamawaki, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/03/2021, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2524666** e o código CRC **16185EA9**.

Aos meus amados pais, Cleides e Vilmar, pois é por eles que dediquei todo meu esforço, onde aprendi que os estudos é a única virtude que levamos dessa jornada, obrigada pela confiança, inspiração e sabedoria, vocês são os “mestres” da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e sabedoria, por me proporcionar tantas pessoas abençoadas em minha trajetória.

Aos meus pais, Cleides e Vilmar, que são meu ponto de equilíbrio e muito do que sou hoje é por eles. A minha irmã Meirieley pelo carinho e atenção quando precisei.

Ao meu companheiro Alexandre, pela dedicação, companheirismo e paciência.

Ao professor Fernando Cezar Juliatti pela orientação e amizade, e por conseguirmos estabelecer uma excelente relação orientada-orientador ao longo desses anos.

A professora Nilvanira Donizete Tebaldi, pela excelente coorientação, a qual me fez me apaixonar ainda mais pela bacteriologia e sem contar pelas inúmeras trocas de conversas e conhecimentos de vida pessoal.

Ao Laboratório de Bacteriologia Vegetal por proporcionar o desenvolvimento deste trabalho e onde pude fazer grandes amizades.

A Lara, técnica do LABAC, por me auxiliar e dar suporte em todo o processo do experimento.

Aos companheiros de Pós-Graduação, em especial, à Isadora que foi meu braço direito nessa jornada, por estar sempre presente, pela troca de conhecimentos tanto pessoal como profissional, e sem dúvida essa pesquisa tem boa parte de sua contribuição minha amiga; A Bruna pelos ensinamentos durante o doutorado, obrigada pela paciência e sabedoria, e por me ensinar amar ainda mais os pets; Ao meu amigo Renan Cezar, pela troca de conhecimentos, e por me fazer dar boas risadas e fazer enxergar que o doutorado pode ser mais leve. A amiga Marina, pela parceria e alegria sempre que a encontrava.

Aos membros da banca por aceitarem o convite e contribuírem para a melhoria deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente, me ajudaram na realização desta conquista, deixo aqui o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Importância da cultura da soja.....	3
2.2. Principais doenças da soja.....	4
2.3 O crestamento bacteriano.....	5
2.3.1 Aspecto gerais da doença.....	5
2.3.2 Etiologia da doença.....	7
2.3.3 Raças de <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	8
2.4 A pústula bacteriana.....	10
2.4.1 Aspecto gerais da doença.....	10
2.5 Etiologia da doença.....	11
2.6 Diversidade de fitobactérias.....	12
2.7 Resistência de plantas a fitopatógenos.....	13
2.8 Avaliação da resistência da soja à <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i> e <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	14
2.8.1 Quantificação de doenças.....	14
CAPÍTULO 1.....	22
RESUMO.....	23
ABSTRACT.....	24
1 INTRODUÇÃO.....	25
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.1 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>glycines</i>	31
3.2 <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>glycinea</i>	36
4 CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO 2.....	45

RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	47
1 INTRODUÇÃO	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	50
2.1 Teste de patogenicidade no hospedeiro e reação de hipersensibilidade.....	53
2.2 Caracterização cultural, bioquímica e fisiológica	53
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS.....	61
CAPÍTULO 3.....	63
RESUMO.....	64
ABSTRACT.....	65
1 INTRODUÇÃO	66
2 MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 Teste de patogenicidade no hospedeiro e reação de hipersensibilidade.....	70
2.2 Caracterização cultural, bioquímica e fisiológica	71
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS.....	79

RESUMO

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Reação de genótipos de soja quanto a resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.** 2021. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

A pústula bacteriana e o crestamento bacteriano, causados por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, respectivamente, são consideradas as principais doenças bacterianas da cultura da soja em todo o mundo. Onde a principal estratégia para o controle dessas bacterioses é através da obtenção de genótipos resistentes. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: (i) avaliar a agressividade dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em casa de vegetação e ambiente controlado; (ii) avaliar a agressividade de isolados bacteriano; (iii) avaliar as reação de genótipos de soja quanto a resistência a *X. axonopodis* pv. *glycines* e *P. savastanoi* pv. *glycinea* em ambiente controlado; (iv) seleção de genótipos resistentes em relação as bacterioses, visto que há poucos estudos sobre este assunto no país. Para a avaliação de agressividade de *Xanthomonas* foi utilizado quatro isolados, e para *Pseudomonas* dois isolados, inoculados via pulverização das folhas, em quatro genótipos de soja com padrões de resistência e suscetibilidade, em casa de vegetação e ambiente controlado, sendo avaliado a severidade por meio de análise visual e escala diagramática de notas. Para a avaliação da reação de genótipos de soja quanto a resistência às bacterioses, foram utilizados quarenta genótipos, onde trifólios destacados foram inoculados via pulverização e distribuídos em GERBOX e armazenados em câmara de crescimento-BOD, no qual ambos os ensaios foram realizados em delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições, totalizando 200 parcelas experimentais. A severidade da pústula e do crestamento bacteriano foram avaliados aos 3, 6, 9, 12 dias após a inoculação, por uma análise visual, empregando notas de 0 a 5, e calculado a Área Abaixo da Curva de Progresso de Doença (AACPD). Os dados obtidos foram ajustados com dos Mínimos Quadrados Generalizados (Generalized Least Squares, GLS) após o atendimento da pressuposição de normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 0,05 de significância. Os isolados UFU C35 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e UFU C3 de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* foram selecionados como os isolados mais agressivos. Todos os genótipos avaliados apresentaram níveis diferentes quanto a resistência aos patógenos. Os genótipos G2 (STWART), G14 (UFU L 196) e G15 (UFU L 586) foram agrupados como altamente resistentes, sendo uma importante fonte de resistência à pústula bacteriana em soja. Para a resistência ao crestamento bacteriano os genótipos, G13 (UFU L 526), G22 (UFU L 176), G38 (UFU L 88), G39 (UFU L 105), G40 (UFU L 200), G7 (NIDERA 7255), G1 (UFU TN 105 AP) e G2 (STWART), foram o que obtiveram maiores níveis de resistência sendo considerados moderadamente resistentes, podendo ser importantes fontes de resistência ao crestamento bacteriano.

Palavras-chave: Crestamento Bacteriano. *Glycine max*. Pústula bacteriana. Resistência.

¹Comitê Orientador: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

ABSTRACT

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Reaction of soybean genotypes for resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.** 2021. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytotechnics) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia.¹

Bacterial pustule and bacterial crestring caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, respectively, are considered the main bacterial diseases of soybean crop worldwide. Where the main strategy for the control of these bacteriosis is through obtaining resistant genotypes. Thus, the present study aimed to: (i) evaluate the aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in greenhouse and controlled environment; (ii) select which bacterial isolate was the most aggressive; (iii) to evaluate the reaction of soybean genotypes regarding resistance to *X. axonopodis* pv. *glycines* and *P. savastanoi* pv. *glycinea* in controlled environment; (iv) selection of resistant genotypes in relation to bacteriosis, since there are few studies on this subject in the country. For the evaluation of the reaction of soybean genotypes regarding resistance to bacteriosis (*Xanthomonas*), forty genotypes were used, where detached trifolia were (*Pseudomonas*) inoculated by leaf spray and distributed in GERBOX and stored in growth chamber-BOD in which both trials were performed in a completely randomized design with five repetitions, totaling 200 experimental plots. (.) The severity of pustule and bacterial crestring were evaluated at 3, 6, 9, 12 days after inoculation, by a visual analysis, using scores from 0 to 5, and the Area Below the Disease Progress Curve (AACPD) was calculated. The data obtained were adjusted by the Generalized Least Squares (GLS) after the assumption of normality of the residues was observed by the Kolmogorov-Smirnov test at 0.05 significance. The UFU C35 isolates from *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* and UFU C3 of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* was selected as the most aggressive isolates. All genotypes evaluated showed different levels of resistance to pathogens. The genotypes G2 (STWART), G14 (UFU L 196) and G15 (UFU L 586) were grouped as highly resistant, being an important source of resistance to bacterial pustule in soybean. For resistance to bacterial blight the genotypes, G13 (UFU L 526), G22 (UFU L 176), G38 (UFU L 88), G39 (UFU L 105), G40 (UFU L 200), G7 (NIDERA 7255), G1 (UFU TN 105 AP) and G2 (STWART), had the highest levels of resistance, being considered moderately resistant, and can be important sources of resistance to bacterial blight.

Keywords: Bacterial pustule. Bacterial Cresting. *Glycine max*. Phytobacteria.

¹Guiding committee: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

1 INTRODUÇÃO

A soja [*Glycine max* (L.) Merr.] está entre as espécies vegetais mais exploradas em todos os segmentos de atividade agrícola, sendo considerada rentável e de grande importância para o mercado mundial, contribuindo com ganhos e gerando economia para todo o Brasil, além do seu grande consumo e movimentação de exportações (CASTRO et al., 2015).

Diante disso, a cultura da soja representa um dos principais propulsores do agronegócio brasileiro. Nos últimos anos, o Brasil manteve-se em segundo lugar no ranking como um dos principais produtores do mundo, atrás apenas dos EUA, porém na safra 2019/20 tornou-se o país com maior produção, a qual apresentou um acréscimo de 2,7%, saindo de 35.874 mil hectares para 36.847,6 mil hectares, com uma produção de 122,1 milhões de toneladas, um recorde na série histórica, tornando-se a principal cultura em termos econômicos, ocupação territorial e importância social do país (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB, 2020).

Esse comportamento foi respaldado pela forte liquidez que o produto apresentou na sua comercialização, ao comportamento recente do câmbio e à epidemia do Corona vírus com as suas repercussões nas cotações da oleaginosa.

Mesmo o Brasil sendo um país promissor para a sojicultura, possuindo grande diversidade climática, que favorece o seu cultivo, são diversas as doenças que acometem a cultura onde são as principais responsáveis pelo insucesso da soja, sendo elas causadas por bactérias, fungos, nematóides e vírus (GRIGOLLI, 2015). Essas moléstias causam danos irreparáveis estabelecendo sérios prejuízos aos produtores, sendo que estimativas anuais podem alcançar perdas de produção de 15% a 20% em decorrência a esses ataques, podendo chegar em casos extremos com perdas de quase 100% (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA, 2011).

Entre os diversos fatores que reduzem a produtividade das culturas e ocasionam grandes prejuízos aos sistemas agrícolas estão as doenças causadas por bactérias fitopatogênicas, cujo controle é dificultado devido à escassez de produtos registrados com atividade antibacteriana. Algumas doenças causadas por bactérias fitopatogênicas comprometem a segurança alimentar e a estabilidade econômica em diversos países.

Dentre as principais doenças bacterianas que afetam a cultura da soja destacam-se a pústula bacteriana, causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) e o crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*), ocasionando perdas na produção de até 40% (WRATHER et al., 2001). Estes patógenos podem ser veiculados por sementes, provocando redução na germinação e vigor, além de originar focos primários de infecção (GOULART, 1997).

A pústula bacteriana, trata-se de uma doença que sendo favorecida em ambientes com alta temperatura e umidade, reduzindo o rendimento dos grãos de 15-40% (KIM et al., 2011). Os sintomas que caracterizam a (*Xag*) iniciam-se por pequenas manchas de coloração verde-amarelada com centro elevado de cor amarelo-palha presentes nas duas faces foliares, que se tornam necróticas em pouco tempo, geralmente com estreito halo amarelo circundante, que pode alargar-se nas lesões mais velhas, em ataques intensos. Essas lesões coalescem, causando desfolha prematura ou tornando a superfície foliar quase totalmente necrosada (JONES; FETT, 1997; SINCLAIR, 1999; NARVEL et al., 2001).

O crestamento bacteriano em um ambiente favorável podem acometer perdas de 5-40% na cultura (HARTAMAN, 1999), devido a sua grande capacidade de destruição foliar, sendo que os principais sintomas de (*Psg*) são surgimento de pequenas lesões encharcadas de aspecto translúcido (anarsaca) com coloração marrom-escura circundada por um halo de coloração verde-amarelada (SINCLAR; HARTMAN, 1999). Com o progresso da doença, as lesões aumentam tornando-se manchas negras, onde nota-se uma pequena película brilhante sobre as lesões, o que configura exsudação de natureza bacteriana (DAMICONE, 2009).

A maioria das cultivares de soja comercializadas no Brasil apresentam resistência à essas fitobactérias, mas cultivares para uso específico na alimentação humana são suscetíveis à doença (VIOLATTI; TEBALDI, 2016). Sendo assim, o método de utilização de cultivares com resistência genética se torna a melhor estratégia para o controle dessas bacterioses, considerada uma medida de baixo custo, que contribui para a preservação do meio ambiente e reduz o uso de produtos químicos fitossanitários (SABATO; TEIXEIRA, 2015). Desta maneira, apesar da resistência genética ser de extrema importância para o manejo integrado da doença, existem poucos trabalhos relacionados ao tema, portanto o objetivo do trabalho foi avaliar a reação de genótipos de soja pertencentes ao programa de

melhoramento genético do Laboratório de Germoplasma da UFU (LAGER/UFU) – *Campus* Umuarama, genótipos usados na a alimentação humana e comercial, quanto a resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, por meio da agressividade dos isolados em dois ambientes, para a seleção dos genótipos mais promissores.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da cultura da soja

A soja é uma planta da família das Fabaceae (leguminosas) com seu centro de origem da Ásia. É originada pelo cruzamento entre duas espécies de soja selvagem que foram domesticadas ainda na antiga China (EMBRAPA, 2019).

Na época de introdução a cultura da soja não era produzida com interesse nos grãos, e sim como planta forrageira, voltada para a alimentação animal. Atualmente, no cenário agrícola mundial a soja é o quarto produto entre os cereais e oleaginosas mais utilizadas no consumo humano, principalmente no setor industrial com a produção de óleos para culinária, sendo considerada uma grande fonte de proteína e o mais importante em produção e comercialização externa (FAO, 2020).

A importância da soja está ligada à versatilidade do uso de seus grãos, que tanto podem ser utilizados para a alimentação humana de forma in natura quanto para a produção de biodiesel. Em razão da qualidade de sua proteína e o baixo custo relativo de sua produção, essa oleaginosa se mostra também promissora pela complementação da dieta, principalmente em países em desenvolvimento (SEDIYAMA et al., 2015).

O Brasil ocupa atualmente a posição de primeiro produtor mundial de soja, assumindo o ranking mundial, em razão de um incremento de 5% de área plantada (CONAB, 2019), e a redução dos Estados Unidos em área de soja para milho em atendimento à demanda americana por etanol (DALL'ANGOL, 2011). Outro aspecto importante é o aumento da produtividade, sem necessidade de incorporação de grandes áreas, o qual esse crescimento demonstra o quanto o sistema produtivo da soja tem se preocupado com o aspecto ambiental, tornando assim o Brasil um dos países com maior

potencial de produção da cadeia da sojicultura no mundo.

O avanço da tecnologia e o aumento da produtividade viabilizaram o Brasil a se tornar o maior produtor mundial, porém, a expansão da área cultivada trouxe também problemas, como o aumento da incidência de pragas, doenças e plantas daninhas (WHARATER, 2010). No caso específico das doenças, a soja está sujeita à ação de uma série de agentes causais, cuja importância depende das condições ambientais, adoção de plantio direto, aumento da população de plantas, cultivos sucessivos, cultivares utilizadas e a presença de patógenos na área de cultivo, os quais geram condições ideais para o desenvolvimento de várias doenças (EMBRAPA, 2011).

Entre as doenças que acometem a cultura, as bacterioses são fitopatógenos de difícil controle, o que resulta em prejuízos econômicos relevantes, devido a sua grande versatilidade em termos do seu metabolismo, podendo facilmente modificar seus mecanismos de ataque ou defesa, com uma maleabilidade adaptativa que possui a capacidade de certas estirpes suplantarem a resistência em cultivares recém introduzidas ou mesmo superarem a ação tóxica de compostos químicos (COOKSEY, 1990; GRENNAN, 2006). Dentre as bacterioses, o crestamento e a pústula bacteriana, causados respectivamente por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, são as doenças bacterianas que mais acometem a produção de soja em todo o mundo (WRATHER et al., 2011).

2.2. Principais doenças da soja

Mesmo com tantos ganhos atualmente para a cultura da soja, a ocorrência por uma gama extensa de doenças, leva o insucesso para a obtenção de altos rendimentos em produtividade. No Brasil, mais de 40 doenças causadas por fungos, bactérias, nematóides e vírus já foram identificadas (JULIATTI et al., 2005). Estes números tendem a aumentar em virtude da expansão da soja para novas áreas, devido a monocultura em algumas regiões, pela capacidade dos patógenos se multiplicarem e modificarem seu organismo, e/ou o risco de patógenos quarentenários.

Dependendo das condições climáticas de cada safra e a mudança de uma região para outra, a importância dessas doenças vem sendo modificadas principalmente em seu poder

de agressividade a planta. A relevância e grau de intensidade de cada doença, modifica com o ano, a região plantada, as cultivares escolhidas, data de semeadura e as práticas agronômicas adotadas.

As principais doenças fúngicas que afetam a cultura da soja são: ferrugem (*Phakopsora pachirhizi*); antracnose (*Colletotrichum truncatum*); mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*); podridão radicular de Phytophthora (*Phytophthora sojae*); cancro da haste [*Diaporthe aspalathi* (sin. *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*) e *Diaporthe caulivora* (sin. *D. phaseolorum* var. *caulivora*)]; crestamento foliar e mancha púrpura (*Cercospora kikuchii*); mancha parda (*Septoria glycines*); mela ou requeima (*Rhizoctonia solani*); míldio (*Peronospora manchurica*); oídio (*Microsphaera diffusa*) (EMBRAPA, 2011).

Em se tratando de fitonematóides os principais para a cultura são: nematoide de cisto (*Heterodera glycines*); nematoide das lesões (*Pratylenchus brachyurus*); nematoide de galhas (*Meloidogyne javanica* e *Meloidogyne incognita*); nematoide reniforme (*Rotylenchukus reniformis*) (EMPRAPA, 2011).

As principais doenças viróticas são: mosaico cálico (*Alfalfa Mosaic Virus*- AMV); queima do broto (*Tobacco Streak Virus* – TSV); mosaico comum da soja (*Soybean Mosaic Virus* – SMV); mosaico do feijão (*Bean Pod Mottle Virus* – BPMV); necrose da haste (*Cowpea Mild Mottle Virus* – TSV) (EMPRAPA, 2011).

Dentre as doenças bacterianas destacam-se: o crestamento bacteriano (*Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*); pústula bacteriana (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*); mancha bacteriana marrom (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*); fogo selvagem (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) (EMPRAPA, 2011).

2.3 O crestamento bacteriano

2.3.1 Aspecto gerais da doença

O crestamento bacteriano causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* é uma das doenças bacterianas mais comuns encontradas nas principais regiões produtoras de soja, com disposição em todo o mundo, principalmente em climas temperados com temperaturas mais amenas (20°C a 26°C), principalmente quando há incidência de chuva

com vento onde proporcionam um ambiente ideal para que a doença surja com maior severidade (GODOY et al., 2014).

Com uma alta destruição foliar, as lesões que essa doença ocasiona pode levar a danos de 5-40% na cultura (HARTMAN, 1999). Porém ainda há uma escassez de estudos conclusivos sobre os danos causados pela bactéria nos cultivares de soja do Brasil.

É uma doença que surge principalmente nas folhas, mas pode ser encontrada em toda a parte da planta, desde a haste até os pecíolos (HENNING et al., 2005). Os primeiros sintomas são pequenas lesões encharcadas de aspecto translúcido (anasarca), que ao passar do tempo, apresentam coloração marrom escura circundada por um halo verde amarelado (SINCLAIR; HARTMAN, 1999). Na medida que a doença vai progredindo, as lesões aumentam e as manchas necrosam assumindo um formato angular, coalescendo, surgindo extensas áreas de tecido morto entre as nervuras secundárias (DAMICONE, 2009).

Em condições mais favoráveis manchas negras são constituídas na face inferior da folha, as quais apresentam uma película brilhante nas horas mais úmidas da manhã, formadas pelo exsudado da bactéria (ALMEIDA, 2005). Folhas jovens são mais vulneráveis a infecção, sendo uma doença notada primeiramente no topo da planta, diferentemente de outras doenças foliares que são iniciadas em folhas mais velhas, onde infecções severas nos estádios mais jovem da planta, conferem aparência enrugada nas folhas, semelhantes ao ataque de vírus.

A penetração da bactéria pode ocorrer em frações de segundos principalmente pelos estômatos ou através de ferimentos, onde há presença de um filme d'água sobre a superfície foliar (FARHATULLAH et al., 2010).

A fitobactéria associada a semente e restos da cultura de safras anteriores, é a principal fonte primária do inóculo, onde no primeiro caso, as sementes não apresentem sintomas claros da presença da bactéria, sendo um problema difícil para sua identificação, onde cotilédones provenientes dessas sementes podem apresentar lesões necrosadas, logo após a emergência, a infecção evolui das folhas unifolioladas para as trifolioladas (GODOY, 2014). De natureza epifítica, a bactéria pode sobreviver em plantas assintomáticas e iniciar o processo de invasão quando em condições favoráveis.

A espécie *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* possui 12 raças fisiológicas já descritas (ABO-MOCH et al. 1995; CROSS et al. 1966; FETT; SEQUERA, 1981; GAO

1998), das quais oito raças já foram encontradas no Brasil (LANNA-FILHO, 2015), onde cinco são símeis às raças R2, R3, R4, R6 e R7 às descritas nos Estados Unidos e as raças R10, R11 e R12 (FERREIRA, 1984; FERREIRA, 1986; FERREIRA; ROMEIRO, 1986; LONG et al., 1985).

Para a raça 4 de *P. savastanoi*, nenhuma fonte de resistência tem sido relatada em genótipos de soja, indicando que o possível gene *avrD* nessa raça tenha sofrido uma mutação que não permite o desencadeando da resposta imune por parte do hospedeiro (KEITH et al., 1997). Essa condição justifica a natureza dominante da raça 4 nos campos de produção em todo mundo, e também expões a dificuldade em achar fontes de resistência entre os genótipos de soja.

No presente momento, cultivares recomendadas para o cultivo não apresentam resistência, com excepcionais exceções, às raças desse patógeno. Sendo notado variações de graus de infestações, atingindo altos e baixos níveis, devido as variações climáticas e a existência de diferenças específicas entre as raças dessa bactéria.

Mesmo com uma diversidade de cultivares lançadas no mercado, o produtor sempre opta por um número restrito, fazendo a utilização contínua de genótipos o que pode levar a suplementação da sua resistência ao patógeno, incluindo as condições favoráveis para o seu desenvolvimento, surtos podem vir acometer a lavoura (LANNA FILHO, 2015). Portanto, a utilização de cultivares resistentes se torna a medida preventiva mais eficaz para o controle de fitobacterioses, sendo uma estratégia promissora, visto que possui ampla ação sobre o espectro de fitopatógenos e também uma boa prática agrícola.

2.3.2 Etiologia da doença

A bactéria *P. savastanoi* pv. *glycinea* é hemibiotrófica, classificada como Gram-negativa, pertencente à Classe Gammaproteobacteria, Ordem Pseudomonadales, Família Pseudomonadaceae e gênero *Pseudomonas*. Se caracteriza por apresentar a forma de bastonetes retos ou curvos e se locomovem pela presença de flagelos polares. O gênero *Pseudomonas* possui uma característica peculiar que é a produção de pigmentos fluorescentes em determinados meios de cultura como o King B (TAYLOR, 1970). Se desenvolvem em meio de cultura com a formação de colônias redondas, branco/creme,

lisas, brilhantes, com bordos irregulares e nota-se uma coloração marrom ao redor do crescimento bacteriano, resultante da produção de melanina em meios nutritivos, tendo sua temperatura ótima de crescimento entre 24-25 °C (SCHAAD et al., 2001).

2.3.3 Raças de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

O termo raça fisiológica é utilizado para descrever os patógenos da mesma espécie, morfológicamente semelhantes e com mesma virulência, onde patógenos de distintas raças fisiológicas apresentam diferentes níveis de virulência. As raças fisiológicas são identificadas ou diferenciadas pela reação que causam num grupo selecionado do hospedeiro cujos componentes são denominados variedades diferenciadoras (BUENO et al., 2001).

Para a identificação de raças fisiológicas utiliza-se a reações de cultivares diferenciais de soja (Acme, Chippewa, Flambeau, Harosoy, Lindarin, Merit e Norchief), (Tabela 1), as quais são utilizadas para a separação racial de acordo com Cross et al. (1966). Também é utilizado estirpes de referência afim de comparar a similaridade com os patógenos de interesse a serem classificados.

Tabela 1. Reação de sete cultivares de soja a diferentes raças de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

Isolados de <i>P. savastanoi</i>	Cultivares de soja						
	<u>Acme</u>	<u>Chippewa</u>	<u>Flambeau</u>	<u>Harosoy</u>	<u>Lindarin</u>	<u>Merit</u>	<u>Norchief</u>
Raça 1	S	R	S	R	R	R	R
Raça 2	S	S(I)	S	S	S	S	S
Raça 4	R	S	S	S	S	S	S
Raça 5	R	R	R	S	R	S	R
Raça 6	S	R	S	R	R	R	S
Raça 8	S(I)	S(I)	S(I)	S(I)	R	S(I)	S(I)
Raça 9	R	S	R	S	S	S	R
Raça 10	R	R	R	S	S	S	R

S = suscetível; I = intermediário; R = resistente. Reações descritas por Cross et al., 1966.

Realiza-se a inoculação dos isolados, no qual as plantas devem ser examinadas constantemente, testadas para cada combinação cultivar-raça, e observadas enquanto aos sintomas, onde folhas com as lesões encharcadas, manchas cloróticas, mudança na forma

de desenvolvimento e atraso no crescimento são consideradas suscetíveis, lesões sem sintomas típicos e baixa taxa de doença são consideradas intermediárias e as folhas sem hidrólise e o escurecimento são designado como resistentes (CROSS et al., 1966).

Entre os principais desafios encontrados por fitopatologistas está a correta diagnose dessas doenças, pois os sintomas e testes bioquímicos não têm sido suficientes para diferenciar as bacterioses ao nível de espécie, patovar e raças (RAIMUNDI, 2014).

O patógeno de *P. savastanoi* pv. *glycinea* possui grande diversidade em seu genoma, visto que a doença pode causar danos (isto é, ser virulenta) em uma determinada cultivar de soja, mas pode induzir HR (seja avirulento) em outra cultivar.

A existência de cultivares diferenciais de soja e raças distintas de *P. savastanoi* pv. *glycinea* é sugestivo de uma interação gene a gene, no qual a expressão de resistência a doenças é especificamente determinados pelos genótipos do hospedeiro e do patógeno, e geralmente é controlado por um único locus dominante (MINGSHENG et. al., 2011).

O locus dominante na planta é geralmente referido como um gene de resistência, e o dominante locus no patógeno é denominado gene de avirulência. Em termos simples, demonstra-se que o gene da avirulência condiciona ou controla a capacidade de uma raça específica de um patógeno induzir uma resposta de defesa (HR) apenas em uma planta específica ou cultivar que contém um específico e, portanto, correspondente, gene de resistência.

Por outro lado, se uma determinada corrida de um patógeno não contém um gene específico de avirulência ou se o hospedeiro tem um alelo recessivo na resistência correspondente locus, a resistência à doença não ocorre e a doença resulta. Assim, as várias combinações de genes de avirulência no genes patógenos e de resistência na planta resultam em um padrão da especificidade de raça-cultivar que é observada em (*Psg*) (STASKAWICZ et al.,1984).

Visto essa grande variação encontrada em seu genoma, há uma dificuldade ainda maior em encontrar os resultados fidedignos para a diferenciação de cultivares para raças de *Pseudomonas*. Embora as respostas das cultivares tenham sido utilizadas para definir raças, é evidente que a partir das variações dos sintomas produzidos por diferentes isolados da mesma raça, que os resultados não representam dados homogêneos nas populações, posto que diferentes isolados em conformidade para um resultado em particular pode

produzir qualquer uma combinação de sintomas locais ou sistêmicos (SCHROTH et al. 1971).

Como bactericidas eficazes não estão disponíveis na agricultura, plantio de cultivares de baixa suscetibilidade e melhoramento para resistência é uma possibilidade para o controle de doenças, onde essa estratégia só pode ser bem-sucedida quando as determinações das raças são conhecidas (SINCLAIR, 1982).

Métodos mais rápidos e eficientes na identificação dessas doenças são necessários, uma vez que a detecção e a correta identificação do agente causal de uma doença são fatores essenciais para se evitar a sua introdução em novas áreas de cultivo, bem como na adoção de práticas eficientes de controle. Portanto, esforços para introduzir cultivares resistentes a *P. savastanoi* pv. *glycinea* devem basear principalmente na correta identificação e resistência à raças existentes do patógeno.

2.4 A pústula bacteriana

2.4.1 Aspecto gerais da doença

A pústula bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, é uma doença foliar comumente encontrada em quase todos os países produtores de soja assim como no Brasil, tendo sua produção limitada por esse patógeno (MANSFIELD et al., 2012). O desenvolvimento do patógeno é favorecido principalmente em regiões quentes e úmidas, onde altos índices de chuvas aumentam a severidade da doença, levando a perdas superiores a 40% da produção (PRATHUANGWONG; AMNUAYKIT, 1987).

É uma doença que reduz o rendimento e tamanho dos grãos devido a infecções severas, principalmente por meio de degradação da clorofila e desfolha prematura (KIM et al., 2011). O patógeno permanece na superfície de plantas saudáveis antes de entrar no apoplasto através de aberturas naturais, como estômatos e ferimentos (CHATNAPARAT et al., 2016). Então o patógeno inicia a síntese de substâncias que causam disfunção nas células do parênquima, ocasionando em hipertrofia e hiperplasia celular, levando a expansão e ruptura da epiderme, exteriorização do tecido e formação da pústula (SAIN; GOUR, 2013).

Os sintomas iniciais são caracterizados por pequenas lesões de coloração verde-

clara (não translúcidas) com centros elevados nas duas superfícies da área foliar (JONES; FETT, 1987). Com o progresso da doença, principalmente em genótipos de soja susceptíveis, manchas de coloração esbranquiçadas se desenvolvem nos centros das lesões, circundadas por halos amarelos ao redor de áreas amarronzadas bem definidas, denominadas pústulas, que é característica marcante a essa doença, especificamente na face abaxial da folha (SINCLAIR, 1999). Halos com coloração menos intensa e pústulas não definidas são observadas em genótipos de soja resistentes (ZINSOU et al., 2015). O patógeno também pode infectar hastes, pecíolos e vagens (GODOY et al., 2014).

As sementes aparentemente sadias são fontes primárias de inóculo, bem como restos de cultura, solo e rizosfera de trigo (KENNEDY; SINCLAIR, 1989). Essa última situação é de suma importância devido a sucessão optada por produtores de trigo-soja, sobrevivendo então em plantas voluntárias de forma epifítica, e mantendo o inóculo para a lavoura de soja a ser instalada posteriormente.

Infecções secundárias da doença são beneficiadas especialmente via chuva-vento, altas temperaturas e umidade elevada a 70%, pelo transporte de gotículas d'água contendo a fitobactéria para plantas sadias, implementos agrícolas e movimentação do homem na lavoura.

A principal medida de controle do patógeno é a utilização de cultivares tolerante ou resistentes, sementes sadias e manejo de restos culturais. A maioria das cultivares de soja comercializadas no Brasil apresentam resistência à pústula bacteriana, mas cultivares para uso específico na alimentação humana são suscetíveis à doença (GODOY et al., 2014).

2.5 Etiologia da doença

A bactéria *X. axonopodis* pv. *glycines* pertence à Classe Gammaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales e Família Xanthomonadaceae. São moveis pela presença de único flagelo de inserção polar, aeróbicas restritas e apresentam reação Gram-negativa. As células se apresentam como bastonetes retos, de tamanho entre 0,4 – 0,7 x 07 – 1,8 micrômetros.

A fitobactéria, quando isolada em ágar nutriente, forma colônias de pigmentação amarelo intensa, resultante de pigmentos conhecidos por xanthomonadinas, brilhantes,

viscosas, de bordos lisos e regulares, circulares, elevadas e mucoides. Sua temperatura ótima de crescimento é 25-30 °C, com a máxima de 35 °C e mínima de 10 °C (HOKAWAT, 1978). O aspecto altamente mucoide das colônias se deve à produção abundante de material capsular pelas células bacterianas, a partir do qual é obtida a goma xanthana.

2.6 Diversidade de fitobactérias

Bactérias, enquanto seres vivos, são organismos altamente organizados, capazes de desenvolver atividades complexas, como metabolismo, reprodução, diferenciação, movimento por autopropulsão e evolução, ao ser capaz de trocar informação genética com seus pares e mudanças em seu metabolismo e em sua estrutura bacteriana, bem como adquirir uma nova raça, além da enorme diversidade, uma determinada espécie de bactéria que sempre exhibe uma espantosa versatilidade fisiológica e bioquímica (ROMEIRO, 2005).

Dentre tantas formas de vida conhecidas, os organismos procariotas, fitobactérias, exibem coletivamente, o maior grau de adaptabilidade e de diversidade de expressão gênica encontrado na natureza.

No caso das bactérias fitopatogênicas, essa adaptabilidade reflete-se na habilidade em sobreviverem sob diferentes condições ambientais, sejam estas climáticas, estádios fenológicos do hospedeiro e, ou, desenvolvendo resistência a defensivos usados em seu controle. Essa capacidade deve-se à existência de diversas rotas metabólicas, as quais podem ter sua expressão diferentemente regulada, dependendo das condições sob as quais a bactéria se encontra.

Com o decorrer do processo evolutivo, as bactérias desenvolvem mecanismos de recombinação gênica, os quais são os responsáveis pela geração de variabilidade, esses mecanismos dão origem, aleatoriamente, a alterações no material genético, as quais, por força de seleção natural, resultam em populações de organismos mais adaptadas as mudanças do ambiente (ROMEIRO, 2005).

Essa plasticidade adaptativa se reflete na capacidade de certas estirpes suplantarem resistência de cultivares recém lançadas ou mesmo de driblarem a ação tóxica de compostos químicos (COOKSEY, 1990).

2.7 Resistência de plantas a fitopatógenos

Visto a imensidade de microrganismos que as plantas estão sujeitas diariamente, apenas uma pequena parcela é capaz de ocasionar doenças as plantas, onde a capacidade do hospedeiro em causar dificuldade para o processo infeccioso dos organismos fitopatogênicos é conhecida como resistência (PARLEVLIET, 1977). A resistência de plantas a doenças, uma regra à medida que a suscetibilidade é exceção (PASCHOLATTI, 1995).

A classificação da resistência segundo Vanderplank (1963), pode ser através de sua efetividade contra as raças do patógeno, onde existem resistências efetivas contra algumas raças do patógeno sendo essa especificidade determinada em função dos genes de resistência presentes na cultivar, e resistência que são efetivas contra todas as raças a qual refere-se à resistência da mesma cultivar a quaisquer raças do patógeno, no primeiro caso temos as resistências verticais, conforme o segundo caso temos as horizontais.

A resistência vertical, também conhecida como qualitativa, pode ser monogênica ou oligogênica, expressa em genes maiores, é um tipo de resistência controlado geneticamente por um único gene, onde observa-se classes distintas de fenótipos, resistente e suscetível, a qual geralmente possui pouca estabilidade, devido aos mecanismos de geração de variabilidade genética, que são as mutações e recombinação, onde os patógenos dominam os genes ligados à resistência (JOHNSON, 1984; VANDERPLANK, 1982).

Já a resistência horizontal ou parcial, é do tipo quantitativa, onde ao invés de se observar classes distintas, como no caso anterior, observa-se uma variação contínua de fenótipos, sendo possível identificar indivíduos que vão do extremo de suscetibilidade ao extremo de resistência, a qual essa variação extensa de fenótipos indica um controle poligênico, em que esse tipo de resistência não impede a infecção de um determinado patógeno, mas retarda o processo (VANDERPLANK, 1963).

De forma geral, a resistência vertical é de curta duração, devido ao patógeno possuir a capacidade de quebrá-la, quando surgem novas raças para as quais as cultivares não possuem resistência, onde a resistência horizontal é uma estratégia de proteção mais durável dos genótipos, pois ela se mantém mesmo com o aparecimento de novas raças

patógeno, devido a capacidade de promover meios eficazes para que não ocorra danos prejudiciais à cultura hospedeira (THOMÉ et. al., 1999).

2.8 Avaliação da resistência da soja à *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

A avaliação e identificação de genótipos superiores no melhoramento de plantas visando a resistência a doenças causadas por bacterioses representa uma importante ferramenta para a agricultura, visto a dificuldade do manejo dessas doenças pela escassez de produtos registrados na cultura, onde o uso de resistência genética é considerado o mais desejável devido ao seu baixo impacto ambiental (SINCLAIR, 2015).

A escolha do melhor método de avaliação é de suma importância para o conhecimento dos fatores envolvidos na interação planta-bactéria, afim de identificar alternativas potencialmente aplicáveis na geração de cultivares com resistência satisfatória, visando aumentar e sustentar a durabilidade da resistência. A condução de ensaios sob condições controladas, é uma pratica eficiente, visto que favorece a identificação da variabilidade entre possíveis raças do patógeno ou grupos de compatibilidade do patógeno (MASCARENHAS; ITO, 1998).

O modelo de avaliação a ser utilizado depende de alguns fatores como: a idade da planta a ser inoculada, a agressividade do isolado, o método de inoculação adotado, a pressão do inoculo, o período de contato com o patógeno inoculado, a taxa de crescimento da doença na planta, tamanho da lesão versus severidade e tempo entre a inoculação e classificação (JULIATTI et al., 2013).

2.8.1 Quantificação de doenças

A quantificação de doenças é conhecida como a fase mais importante no manejo de doenças em plantas (KRANZ,1988) utilizada para estudos de medidas de controle e caracterização de resistência como para estudos epidemiológicos e aferição de danos provocados. Variáveis utilizadas na presente pesquisa são descritas:

a) Curva de progresso da doença

A curva de progresso da doença mostra o desenvolvimento de uma epidemia em um período de tempo sob a influência de condições ambientais (MADDEN, 1980). A curva de progresso da doença, usualmente expressa pela plotagem da proporção de doença versus tempo, é a melhor representação de uma epidemia. Através dela, interações entre patógeno, hospedeiro e ambiente podem ser caracterizadas, estratégias de controle avaliadas, níveis futuros de doença previstos e simuladores verificados (BERGAMIN FILHO, 1995).

b) Severidade

A severidade (porcentagem da área ou volume de tecido da planta coberto por sintomas) é a variável mais utilizada para quantificar doença foliares (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). A severidade de doenças é geralmente avaliada visualmente, onde em doenças bacterianas a avaliação da severidade tem sido realizada com o auxílio de escalas diagramáticas de notas. Entre as vantagens do emprego dessa variável para a quantificação de doenças, pode-se citar o fato de ser mais precisa expressando o dano real causado pelos patógenos, a melhor caracterização do nível de resistência a um patógeno e pelo fato de ser quantitativa.

REFERÊNCIAS

- ABO-MOCH, F., MAVRIDIS, A., AND RUDOLPH, K. Determination of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* occurring in Europe. *J. Phytopathol. [s.l.]*, v.143 p.1-5, 1995.
[DOI:10.1111/j.1439-0434.1995.tb00190.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1995.tb00190.x)
- ALMEIDA, A. M. R. et al. Doenças da soja. *In: KIMATI, H. et al. (Eds.). Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas.* São Paulo: Agronômica Ceres, vol. 2, p. 569-588, 2005.
- AMORIM, L. **Avaliação de Doenças.** *In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.) Manual de Fitopatologia: Princípios e conceitos.* São Paulo, Editora Agronômica Ceres Ltda., 1995, v.1, cap.32, p.645-671.
- BERGAMIN FILHO, A. **Curvas de progresso da doença.** *In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, A. Manual de fitopatologia.* 3.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p. 602-625.
- BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. **Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico.** São Paulo: Ceres, 1996. 299p.
- BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. *In: BUENO, L.C.S.; MENDES, A.N.G.; CARVALHO, S.P. (ed.) Melhoramento de Plantas.* Lavras: UFLA, 2001. p.182-201.
- CASTRO, L. S.; MIRANDA, M. H.; LIMA, J. E. Indicadores sociais de desenvolvimento e a produção de soja: uma análise multivariada nos 150 maiores municípios produtores brasileiros. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, Taubaté, v. 11, n. 1, p. 69-87, 2015.
- CHATNAPARAT, T.; PRATHUANGWONG, S.; LINDOW, S.E. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. **Mol Plant Microbe Interact. [s.l.]**, v. 29, p.508-522, 2016. [DOI: 10.1094/MPMI-01-16-0007-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0007-R)
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **CONAB.** Acompanhamento da safra brasileira: grãos - safra 2019/20 – sétimo levantamento, v. 7, n. 7, p. 1-158, 2020.
- COOKSEY, D. A. Genetics of bactericide resistance in plant pathogenic bacteria. **Annual Review of Phytopathology, [s.l.]**, v. 28, p. 201-19. 1990.
- CROSS, I. E., B. W. KENNEDY, J. W. LAMBERT, R. L. COOPER. Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. **Plant Dis. [s.l.]**, v.50, p.557-560, 1966.

DALL'AGNOL, A. A soja no Brasil: evolução, causas, impactos e perspectivas. *In*: CONGRESSO DE LA SOJA DEL MERCOSUL, 5., 2011, Argentina, [Anais] Rosário: 2011.

DAMICONE, J. Bacterial blight outbreak on soybeans. **Pest Alerts**, Oklahoma, v. 8 n.27, p. 1-4. 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO- EMBRAPA. **História da soja**. Londrina, PR, 2019. Disponível em: www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/história. Acesso em: 05 dez. de 2019.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA NA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja** – Região Central do Brasil 2012 e 2013. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2011, 264 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA NA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Tecnologias de Produção de Soja: Paraná. Centro Nacional de Pesquisa de Soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2007, p. 151-157.

FOOD EN AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. [S. l.: s. n.]. Disponível em: <http://www.fao.org/countryprofiles/index/en/?lang=es&iso3=PRY>. Acesso em: 14 abr. 2020.

FARHATULLAH; GROOSE, R.W.; RAZIUDDIN; AKMAL, M.; INAYATULLAH, M. Mapping gene for bacterial blight (rpg4locus) in soybean. **Pakistan Journal of Botanic., [s.l.]**, v. 42, p. 2145-2149, 2010.

FERREIRA, L.P. *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*: série diferenciadora, herança da resistência, bacteriófagos e serologia. Viçosa:UFV, 1986. 108 p.

FERREIRA, L.P. Raças fisiológicas de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Coerper) Young, Dye & Wilkie, agente do crestamento bacteriano da soja [*Glycine max* (L.) Merrill]. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.9, p.385. 1984.

FERREIRA, L.P.; ROMEIRO, R.S. Ampliação de cultivares da série diferenciadora de raças fisiológicas de *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* em soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília v.11, p. 335. 1986.

FETT, W. F., L. SEQUEIRA. Further characterization of the physiologic races of *Pseudomonas glyecinea*. **Rev. Plant Pathol.** [s.l.], v.70, p.877-891. 1981.

GAO, J. Physiological specialization of the bacterial blight pathogen of soybeans *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Journal of Jiling Agricultural University**, [s.l.], v.20, p.10-12, 1998.

GODOY, C. V.; ALMEIDA, A. M. R.; SOARES, R. M.; SEIXAS, C. D. S.; DIAS, W. P.; MEYER, M. C.; COSTAMILAN, L.M.; HENNING, A. A. Doenças da soja. **Sociedade Brasileira de Fitopatologia**, 2014. 32 p.

GRENNAN, A.K. Plant response to bacterial pathogens. Overlap between Innate and gene-for-gene defense response. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 142, p. 809-11. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.106.900207>

GRIGOLLI, J. F. J. **Manejo de doenças na cultura da soja**. In: TECNOLOGIA e Produção: Soja 2014/2015. Maracaju: Fundação MS, 2015. p. 134-156.

HARTMAN, G.L. **Compendium of soybean diseases**. The American Phytopathological Society: APS Press, 1999.

HENNING, A. A.; ALMEIDA, A. M. R.; GODOY, C. V.; SEIXAS, C. D. S.; YORINORI, J. T.; COSTAMILAN, L. M.; FERREIRA, L. P.; MEYER, M. C.; SOARES, R. M.; DIAS, W. P. **Manual de identificação de doenças de soja**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. 60 p.

JONES, S.B.; FETT, W.F. Bacterial pustule disease of soybean: microscopy of pustule development in a susceptible cultivar. **Phytopathology**, [s.l.], v.77, n.2, p. 266-74. 1987. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-77-266>

JULIATTI, F. C.; CAIRES, A. M.; JULIATTI, B. C. M.; BORIN, M. R.; SOUZA FILHO, D. J. Reação de genótipos de soja transgênicos e convencionais à podridão branca da haste. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 4, n. 4, p. 921-931, 2013.

JULIATTI, F. C.; POLIZEL, A. C.; BALARDIN, R. S.; VALE, F. X. R. Ferrugem da soja: epidemiologia e manejo para uma doença reemergente. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Uberlândia, v. 13, p. 351-395, 2005.

KEITH, L. W. BOYD, C.; KEEN, N. T.; PARTRIDGE, J. E. Comparison of avrD alleles from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s.l.], v. 10, p. 416-422, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.3.416>

KENNEDY, B.W.; SINCLAIR, J.B. Bacterial pustule. In: SINCLAIR, J.B.; BACKMAN, P.A. **Compendium of Soybean Diseases**. Minnesota: American Phytopathological Society. p.106, 1989.

KIM, D.H., KIM, K.H., VAN, K., KANG, Y. J., YOON, M. Y., MOON, J. K. RNA-Seq Analysis of a Soybean Near-Isogenic Line Carrying Bacterial Leaf Pustule-Resistant and Susceptible Alleles. **DNA Research**, [s.l.], v.18, p.483-497, 2011. DOI: [10.1093/dnares/dsr033](https://doi.org/10.1093/dnares/dsr033)

KING, E. O., M. K. WARD, D. E. RANEY. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **J. Lab. Clin. Med.** [s.l.], v.44, p. 301-307, 1954.

KRANZ, J. **Measuring plant disease**. In: KRANZ, J.; ROTEM, J. *Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology*, Heidelberg, Springer, 1988, p.35-50. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-95534-1_4

LANNA-FILHO, R. Fitobactérias na cultura da soja. In: Lemes, E. M.; Castro, L.H. S.; Assis, R. T. (org.). **Doenças da soja: melhoramento genético e técnica de manejo**. Campinas: Millennium, p. 83-92, 2015.

LONG, M., P. BARTON-WILLIS, B. J. STASKAWICZ, D. DAHLBECK, N. T. KEEN. Further studies on the relationship between glyceollin accumulation and the resistance of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Phytopathology**, Califórnia, v.75, p. 235-239, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-235>

MADDEN, L.V. Quantification of disease progression. **Protection Ecology**, Thessalonik, v. 2, p. 159-176, 1980.

MANSFIELD, J., GENIN, S., MAGORI, S., CITOVSKY, V., SRIARIYANUM, M., RONALD, P. Top 10 bactérias patogênicas de plantas em patologia molecular de plantas. *Mol. Plant Pathol*, [s.l.], v.13, p. 614–629. 2012. DOI: [10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x](https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00804.x).

MASCARENHAS, H. A. A.; ITO, F.M. Soja IAC/IAS-5: Cultivar suscetível ao cancro da haste. **Bragantia**, Campinas, v. 57, n. 2, p. 267-269, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0006-87051998000200008>

MINGSHENG QI, DONGPING WANG, CARL A. BRADLEY, YOUFU ZHAO. Genome Sequence Analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and Subtractive Hybridization-Based Comparative Genomics with Nine *Pseudomonads*. **PLoS ONE**, [s.l.], v. 6, p. 16451, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016451>

NARVEL, J.M.; JAKKULA, L.R.; PHILLIPS, D.V.; WANG, T.; LEE, S.H.; BOERMA, H.R. Molecular mapping of Rxp conditioning reaction to bacterial pustule in soybean. **Journal of Heredity**, [s.l.], v. 92, p. 267-70, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/92.3.267>

PARLEVLIT, J. E.; ZADOKS, J. C. The integrated concept of disease resistance; a new view including horizontal and vertical resistance in plants. **Euphytica**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 5-21, 1977. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00032062>

PRATHUANGWONG, S., AND AMNUAYKIT, K. Studies on tolerance and rate reducing bacterial pustule of soybean cultivars/lines. **Natural Science**, [s.l.], v.21, p.408-420, 1987.

RAIMUNDI, M. K., **Caracterização e identificação de isolados bacterianos patogênicos ao cafeeiro**. Lavras: UFLA, p. 79, 2014.

- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2.ed.Viçosa: UFV, p.417, 2005.
- SABATO, E. O.; TEIXEIRA, F.F. **Processos para Avaliação da Resistência Genética de Genótipos de Milho aos Enfezamentos Causados por Mollicutes**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 8 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 210).
- SAIN, S.K.; GOUR, H.N. Pathological and physio-biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, incitent of *Glycine max* leaf pustules. **Indian Phytopathology**, [s.l.], p.66, n.1, p. 20-7, 2013.
- SCHAAD, N. W.; JONES, J. B.; CHUN, W. **Plant pathogen bacterias**. 3nd ed. Saint Paul: APS, 2001. 373 p.
- SCHROTH, M.N., V.B. VITANZA, AND D.C. HILDEBRAND. Pathogenic and nutritional variation in the halo blight group of fluorescent pseudomonads of bean. **Phytopathology**, [s.l.], v. 61, p. 852-857, 1971. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-61-852>
- SEDIYAMA, T., SILVA, F., BORÉM, A. **Soja: do plantio à colheita**. Viçosa:UFV Ed. UFV, 2015. 333p.
- SINCLAIR, J. B. Compendium of Soybean Diseases, Second Edition. **American Phytopathol. Soc**, St Paul, Minn., USA, p.104, 1982.
- SINCLAIR, J.B. Bacterial pustule. In: HARTMAN, G.L.; SINCLAIR, J.B.; RUPE. J.B. **Compendium of Soybean Diseases**. Saint Paul: The American Phytopathological Society. [s.l.], p. 6-7, 1999.
- SINCLAIR, J.B.; HARTMAN, G.L. **Compendium of soybean Diseases**. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 1999. 128 p.
- SINGH, P. S.; TERÁN, H. Evolution of screening methods for detection of physiological resistance to White mold in common bean. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, East Lansing, v. 51, p. 40-41, 2008.
- SLEESMAN, J.P.; C. LEBEN; A.F. SCHMITTHENNER; E. COYLE. Relation of *Pseudomonas glycinea* to systemic toxemia in soybean seedlings. **Phytopathology**, v. 59, p.1970, 1971.
- STASKAWICZ, B. J., DAHLBECK, D., AND KEEN, N.T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.)Merr. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p. 6024-6028, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.6024>
- TAYLOR, J. D. The quantitative estimation of the infection of bean seed with *Pseudomonas phaseolicola* (Burkh.) Dowson. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 66, p. 29-39, 1970. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1970.tb04599.x>

THOMÉ, G. C. H. **Genética e análise molecular da resistência parcial à ferrugem da folha em aveia**. 1999. 126 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

VANDERPLANK, J. E. **Host-Pathogen Interaction in Plant Disease**. Academic Press, New York, London, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-092635-3.50004-8>

VANDERPLANK, J. E. **Plant diseases: epidemics and control**. Academic Press: London, New York, p. 349, 1963.

VIDIĆ, M.; DORDEVIĆ, V.; PETROVIĆ, K.; MILADINOVIĆ, J. Review of soybean resistance to pathogens. **Ratarstvo ipovrtarstvo**, v.50, p. 52-61, 2013. DOI: <https://doi.org/10.5937/ratpov50-4038>

WRATHER, A. *et al.* Effect of diseases on soybean yield in the top eighth producing countries in 2006. **Plant Health Progress**, p.125, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-0102-01-RS>

WRATHER, J.A.; ANDERSON, T.R.; ARSYAD, D.M.; TAN, Y.; PLOPER, L.D.; PORTA-PUGLIA, A.; RAM, H.H.; YORINORI, J.T. Soybean disease loss estimates for the top ten soybean- producing countries in 1988. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 23, n.2, p.115-21, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060660109506918>

YOUNG, J.M.; TRIGGS, C.M. Evaluation of determinative tests for pathovar of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. **J. Appl Bacteriol.**, Oxford, v.77, p.195-207, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03064.x>

CAPÍTULO 1

AGRESSIVIDADE DE ISOLADOS DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* E
Pseudomonas savastanoi pv. *glycinea* EM SOJA, EM CASA DE VEGETAÇÃO E
CÂMARA DE CRESCIMENTO

RESUMO

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Agressividade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em soja, em casa de vegetação e câmara de crescimento em soja.** 2021. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

A soja no Brasil é uma das culturas mais importantes devido ao seu alto valor econômico, geração de emprego e expressão no mercado interno e externo. No entanto, a cultura é frequentemente ameaçada por um amplo número de doenças, reduzindo sua produtividade e gerando perdas econômicas aos produtores. Onde a pústula bacteriana e o crestamento bacteriano, causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) respectivamente, são as principais doenças bacterianas que acometem a cultura, ocasionando perdas na produção de até 40%. O objetivo do trabalho foi avaliar e selecionar os isolados mais agressivos dessas bacterioses, visto que são patógenos de difícil controle por serem organismos que possuem uma capacidade adaptativa alta e por possuírem raças que podem suplantar resistência em novas cultivares. Quatro experimentos foram conduzidos, dois em casa de vegetação e dois no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia. O experimento foi em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os genótipos utilizados foram: Monsoy 7739 PRO e Desafio RR considerados como padrões de resistência e Embrapa 48 e BRS MG 790 A, como padrão de suscetibilidade, os quais foram inoculados pelo método de pulverização com quatro isolados de (*Xag*): UFU C35, UFU C37, UFU C38 e UFU 40 e dois de (*Psg*): UFU C3 e UFU C41, quando as plantas apresentaram de 3 a 4 trifólios em casa de vegetação e para BOD utilizados os trifólios destacados distribuídos em GERBOX. A severidade da pústula bacteriana em casa de vegetação foi avaliada 3, 5, 7, 9, 11 e 15 dias após a inoculação em BOD a avaliação foi em 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação. Para o crestamento bacteriano em ambos os experimentos, foram avaliados 3, 6, 9, 12 e 15 dias após a inoculação. A severidade da doença foi calculada usando uma escala de notas variando de 0 a 5, calculando-se a área abaixo da curva do progresso da severidade. Os dados de AACPS de cada experimento foram submetidos Análise de Variância (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. Todos os genótipos avaliados apresentaram sintomas típicos da pústula bacteriana e crestamento bacteriano. O isolado UFU C35 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* foi o mais agressivo em ambos ambientes de avaliação. O isolado UFU C3 de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* foi o mais agressivo em ambos ambientes de avaliação. De forma geral, a casa de vegetação e BOD não apresentaram diferença na expressão da severidade da doença.

Palavras-chave: Crestamento Bacteriano. Doenças. Inoculação. Pústula bacteriana.

¹Comitê Orientador: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

ABSTRACT

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Assessment of adhesion aggressiveness of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* E *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in greenhouse and soybean growth chamber.** 2021. Thesis (PhD in Agronomy / Phytotechnics) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia.¹

The soybeans in Brazil is are one of the most important crops due to its high economic value, job creation and expression in the domestic and foreign markets. However, culture is often threatened by a large number of diseases, reducing its productivity and generating economic losses to producers. Where bacterial pustule and bacterial crestring, caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (*Xag*) and *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (*Psg*) respectively, are the main bacterial diseases that affect the culture, causing losses in production of up to 40%. The objective of this study was to select and know the aggressiveness of these bacteriosis, since they are pathogens that are difficult to control, because they are organisms that have a high adaptive capacity and because they have breeds that can supplant resistance in new cultivars. Four experiments were conducted, two in a greenhouse and two in the Plant Bacteriology Laboratory in a completely randomized design, with five replications. The genotypes used were: Monsoy 7739 PRO and Desafio RR considered as resistance standards and Embrapa 48 and BRS MG 790 A, as a susceptibility pattern, which were inoculated by the spray method with four isolates of (*Xag*): UFU C35, UFU C37, UFU C38 and UFU 40 and two of (*Psg*): UFU C3 and UFU C41, when the plants presented from 3 to 4 trifolios in a greenhouse in bod used the trifolios highlighted in GERBOX. The severity of bacterin pustule in greenhouse was evaluated 3, 5, 7, 9,11 and 15 days after inoculation, in BOD the evaluation was at 3, 6, 9, 12 and 15 days after inoculation. For bacterial crestring in both experiments, 3, 6, 9, 12 and 15 days after inoculation were evaluated, where the severity of the disease was calculated using a scalding of notes ranging from 0 to 5, calculating the area below the severity progress curve. All genotypes evaluated showed typical symptoms of bacterial pustule and bacterial crestring. The Isolate UFU C35 of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* was the most aggressive in both evaluation environments. The Isolate UFU C3 of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* was the most aggressive in both evaluation environments. In general, the greenhouse and BOD showed no difference in the expression of the severity of the disease.

Keywords: Bacterial Crestring. Disease. Inoculation. Bacterial pustule.

¹Steering Committe: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max*) no Brasil está vulnerável a ocorrência de várias doenças, entre elas a pústula bacteriana e o crestamento bacteriano, causadas por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (Xag) e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg) respectivamente, as quais são consideradas as doenças bacterianas mais sérias para essa cultura (ACCO et. al., 2020).

Os sintomas são especificamente expressos nas folhas, podendo atacar também haste, pecíolos e vagens. Para ambas as bacterioses os sintomas são parecidos, no entanto a pústula bacteriana inicia-se por pequenas manchas de coloração verde-amarelada com o centro elevado de cor amarelo-palha, que se tornam necróticas em pouco tempo, já o crestamento bacteriano se caracteriza pelo surgimento de pequenas lesões encharcada de aspecto translúcido, que apresentam coloração marrom-escuro circundada por um halo verde-amarelado, que coalescem como progresso da doença (DAMICONE, 2009). Esses sintomas são reflexos de fitotoxinas bacterianas que interferem em metabolismos importantes da planta, as quais estão diretamente envolvidas na agressividade dos patógenos (REZENDE; BERGAMIN FILHO, 2018).

Essas bacterioses são de difícil controle, resultando em prejuízos econômicos relevantes devido ao insucesso das práticas de manejo. São organismos que possuem uma capacidade adaptativa alta, por possuírem estirpes/raças que podem suplantar resistência em novas cultivares (BONDARCZUK; PIOTROWSKA-SEGET, 2013).

A utilização de cultivares resistentes é o único controle eficiente em áreas com a existência desses patógenos. A maioria das cultivares de soja comercializadas no Brasil apresentam resistência parcial a essas enfermidades, porém podem ocasionar surtos epidêmicos quando se tem condições favoráveis e o uso de uma cultivar suscetível, que é o caso de cultivares para o uso específico na alimentação humana que são vulneráveis à doença (YORINORI et. al., 2015).

Em monitoramentos realizados em áreas produtoras de soja no estado do Paraná, foi identificado esporadicamente a incidência dessas doenças em campo, onde relataram em 15,01% das lavouras analisadas o surgimento dessas bacterioses (BONALDO et. al., 2009). O aparecimento dessas doenças, se dá pelo fato da utilização de cultivares transgênicas

clandestinas, sem certificação e provenientes dos Estados Unidos e Oriente, e o uso continuado de uma única fonte de resistência à doença (LANNA FILHO, 2015).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo, a identificação da agressividade de diferentes isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, e a seleção dos isolados mais agressivo para utilização nos demais experimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e na Casa de Vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia – MG, com coordenadas geográficas 18° 53' 4.967" S e 48° 15' 36.788" W, entre setembro e dezembro de 2018.

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir da coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Instituto de Ciências Agrárias da UFU. Os isolados utilizados no experimento foram provenientes de sementes e campos de soja (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* e *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* e seu local de coleta.

Isolados <i>X. axonopodis</i>	Campo de Origem
UFU C35 SEMENTE	Indianópolis-MG
UFU C37 SEMENTE	Tapuírama-MG
UFU C38 SEMENTE	Rio Verde-GO
UFU C40 SEMENTE	Paraná
Isolados de <i>P. savastanoi</i>	Campo de Origem
UFU C3 FOLHA SOJA	Paraná
UFU C41 FOLHA SOJA	Uberlândia-MG

Fonte: Autora

Os isolados bacterianos UFU C35, UFU C37, UFU C38 e UFU C40, de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, foram recuperados e multiplicados em meio de cultura 523 (KADO; HESKETT, 1970) por 24-48 horas a 28 °C. A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada autoclavada, ajustada em espectrofotômetro para OD₅₅₀ = 0,5, correspondendo aproximadamente a 1x10⁹ UFC mL⁻¹ (MARCUIZZO et al., 2009).

Os isolados bacterianos UFU C3 e UFU C41, de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, foram recuperados e multiplicados em meio de cultura King B (KING et al., 1954) por 24-48 horas a 28 °C. A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada autoclavada, ajustada em espectrofotômetro para OD₅₄₀=0,2 correspondendo

aproximadamente a 1×10^8 UFC mL⁻¹ (ANDRADE et al., 2013).

Foram semeados quatro genótipos para a avaliação da severidade dos isolados. Os genótipos Monsoy 7739 IPRO (G1) e Desafio RR (G2) foram considerados como padrões de resistência, e os genótipos Embrapa 48 (G3) e BRS MG 790 A (G4), utilizados na alimentação humana, como padrão de suscetibilidade. As plantas foram cultivadas em vasos plásticos de 500 mL, contendo substrato solo, areia e húmus na proporção de (4:1:1), em ambiente de casa de vegetação, sendo uma planta por vaso.

Os genótipos foram avaliados em dois ambientes: casa de vegetação e câmara de crescimento.

Na casa de vegetação, o experimento ocorreu entre os meses de setembro e novembro de 2018 em temperaturas entre 23 °C a 25 °C, e mantendo-se o solo sempre na capacidade de campo. Quando as plantas quando apresentaram de três a quatro trifólios, aproximadamente 15 dias após a semeadura, elas foram inoculadas via pulverização das folhas, com a suspensão bacteriana, sempre ao final da tarde com temperaturas amenas. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 h antes e após a inoculação. Foi instalado uma testemunha, inoculada com água destilada, apenas para checagem da eficiência da inoculação. No terceiro dia após a inoculação, iniciou-se a avaliação da agressividade dos isolados.

Os experimentos foram conduzidos em um delineamento experimental inteiramente casualizado e a unidade experimental constou de uma planta por vaso.

Para *Xag*, o experimento consistiu em um esquema fatorial (quatro isolados x quatro genótipos), com cinco repetições. As avaliações foram realizadas em um intervalo de dois dias, totalizando seis avaliações.

Para *Psg*, o experimento constituiu em um esquema fatorial (dois isolados x quatro genótipos), com cinco repetições. As avaliações foram realizadas em um intervalo de três dias, totalizando cinco avaliações.

A avaliação da severidade foi realizada no primeiro trifólio da planta.

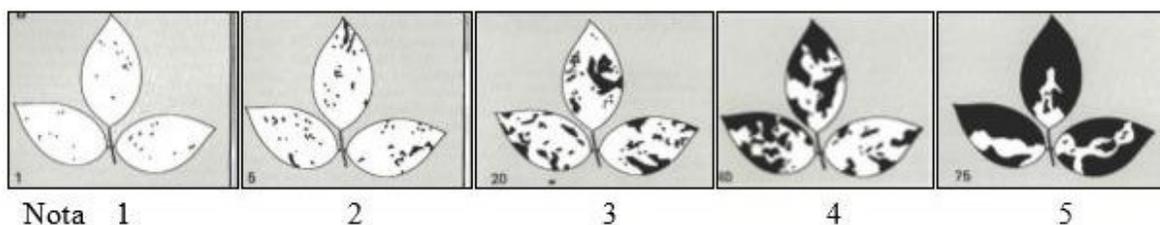
O experimento na câmara de crescimento foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Vegetal UFU/ICIAG entre os meses de novembro e dezembro de 2018. Quando as plantas apresentaram de três a quatro trifólios (aproximadamente 15 dias após a semeadura, plantas semeadas em casa de vegetação), foram submetidas a câmara úmida por

24 h, após isso, os trifólios foram destacados, lavados em água destilada, colocados em bandejas com papel toalha, afim de evitar o encharcamento e submetidos a inoculação via pulverização. Os trifólios inoculados foram distribuídos em GERBOX com papel filtro umedecido com água destilada e com uma estrutura suspensa para não se ter o contato dos trifólios com o papel e armazenados em câmara de crescimento incubadora, BOD - (Demanda Bioquímica de Oxigênio).

O experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco repetições, onde a unidade experimental constou de um trifólio destacado por caixa GERBOX[®]. Para *Xag* o experimento constituiu em um esquema fatorial (quatro isolados x quatro genótipos). Para *Psg* o experimento constituiu em um esquema fatorial (dois isolados x quatro genótipos). Em ambos experimentos, após a inoculação as plantas foram transferidas para a câmara de crescimento, com temperatura entre $\pm 30^{\circ}\text{C}$ para *Xag* e $\pm 20^{\circ}\text{C}$ para *Psg* e avaliadas quanto a severidade em um intervalo de três dias, totalizando cinco avaliações.

A severidade da pústula bacterina em casa de vegetação foi avaliada ao três, cinco, sete, nove, onze e quinze dias após a inoculação, em BOD a avaliação foi em três, seis, nove, doze e quinze dias após a inoculação. Para o crescimento bacteriano em ambos os experimentos, foram avaliados três, seis, nove, doze e quinze dias após a inoculação. A severidade da doença foi quantificada por meio de análise visual empregando-se a escala diagramática modificada descrita por Basu e Butler (1986) (Figura 1), onde a nota 0 correspondeu a plantas sem sintomas e nota 5 atribuída a morta da folha.

Figura 1- Escala diagramática modificada descrita por Basu e Butler (1986). Onde as notas: com notas variando de 0 a 5, onde: 0 = folha sem sintoma, 1 = de 1 a 4,9% da folha lesionada, 2 = de 5 a 19,9% da folha lesionada, 3 = de 20% a 39,9% da folha lesionada, 4 = de 40 a 74,9% da folha lesionada e 5 = acima de 75% da folha lesionada.



Com as notas da escala diagramática ao longo dos dias, foi estimado a Área Abaixo da Curva do Progresso da Severidade (AACPS), calculada pela fórmula:

$AACPS = \sum ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) (t_{i+1} - t_i)$, onde: Y representa a intensidade da doença, t o tempo e i o número de avaliações no tempo.

Para os dados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, como o intervalo das avaliações em casa de vegetação foram diferentes daquelas em BOD, os experimentos foram considerados como independentes. Os dados de AACPS de cada experimento foram submetidos análise de variância (ANOVA) após a checagem das pressuposições de normalidade dos resíduos, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e de homogeneidade de variâncias, pelo teste de Levene, ambos a 0,05 de significância. Diferenças significativas detectadas entre os tratamentos pela ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Para os dados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, procedeu-se com a técnica de Análise Conjunta, pois o intervalo e número de avaliações foram iguais nos dois ambientes analisados. Para isto, procedeu-se com a ANOVA individual dos ambientes casa de vegetação e BOD para cálculo da variância residual de cada experimento. As variâncias residuais foram consideradas homogêneas e a análise conjunta adequada se a relação entre o maior e menor quadrado médio do resíduo (QMr^+ / QMr^-) foi menor do que sete (Gomes e Garcia 2002).

Se atendido esta relação, os dados de AACPS foram submetidos à análise conjunta, após a checagem das pressuposições de normalidade dos resíduos, pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e de homogeneidade de variâncias, pelo teste de Levene, ambos a 0,05 de significância. Diferenças significativas detectadas entre os tratamentos na Análise Conjunta, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 0,05 de significância. A testemunha não foi utilizada na análise estatística dos experimentos, sendo inserida apenas para observar se a inoculação foi eficiente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

As pressuposições da ANOVA foram atendidas para ambos os experimentos (Estatística do teste de Levene Casa de Vegetação=0,010 / BOD=0,012 e Estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov Casa de Vegetação=0,462 / BOD=0,140) procedendo-se com a análise. A interação entre Genótipo e Isolado foi significativa a 1% de probabilidade para Casa de vegetação e 5% de probabilidade para BOD pelo teste de F (Tabela 2).

Tabela 2. Quadro da Análise de Variância (ANOVA) para a Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em diferentes genótipos avaliados em Casa de Vegetação e BOD.

Causas de variação	gl	Casa de vegetação		BOD	
		QM	F	QM	F
Genótipo (G)	3	410,03	11,272**	1088,3	10,142**
Isolado (I)	3	306,87	8,437**	445,16	4,149**
G * I	9	170,98	4,700**	219,23	2,043*
Resíduo	64	36,375		107,29	
CV		42,85%		64,01%	

gl: graus de liberdade; CV: coeficiente de variação.

Os resultados obtidos com o teste de agressividade demonstram diferenças na severidade da doença entre os isolados, sendo UFU C35, UFU C37 e UFU C40 os que possuíram maiores níveis de agressividade em relação ao isolado C38 em ambos os ambientes de avaliação (Tabela 3).

Em casa de vegetação, de maneira geral os isolados UFU C35, UFU C37 e UFU C40 apresentaram maior agressividade (maior AACPS) quando comparado ao isolado UFU C38. No entanto, o isolado UFU C35 possuiu uma maior AACPS, quando comparado com os quatro genótipos avaliados, sendo considerado o isolado bacteriano mais agressivo. Em BOD, o genótipo G4 foi mais suscetível aos isolados UFU C38 (28,8) e UFU C40 (30,3) quando comparado aos demais genótipos. Por ser um genótipo voltado para alimentação humana, de acordo com VIOLATTI e TEBALDI (2016), deve se ter uma preocupação maior, devido à falta de resistência como a determinados patógenos como *Xanthomonas*

axonopodis pv. *glycines*. Esses dois isolados foram considerados menos agressivos para os demais genótipos avaliados, porém quando na presença de um genótipo suscetível e condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, independentemente do nível de sua agressividade, a doença irá se manifestar e acometerá danos a planta. Este fator foi possível de observar no genótipo G4 em BOD não acontecendo o mesmo em casa de vegetação, que por alguma interferência do ambiente, o patógeno não conseguiu expressar todo o seu potencial.

Tabela 3. Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em diferentes genótipos em casa de vegetação e BOD.

Casa de vegetação					BOD				
Isolado	Genótipo				Isolado	Genótipo			
	G1	G2	G3	G4		G1	G2	G3	G4
C35	24,4 Bb	12,2 Aa	12,2 Aa	25 Bb	C35	26,1 Ca	17,1 Aa	15,9 Aa	25,5 Aa
C37	20,8 Bb	3,0 Aa	5,6 Aa	18,4 Bb	C37	20,7 BCa	13,2 Aa	19,5 Aa	23,7 Aa
C38	7,4 Aa	12,4 Aa	13,6 Aa	5,8 Aa	C38	0,0 Aa	10,8 Aa	9,3 Aa	28,8 Ab
C40	18,0 Bab	11,2 Aa	11,2 Aa	24,0 Bb	C40	8,7 Ba	2,1 Aa	7,2 Aa	30,3 Ab

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Em BOD, o genótipo G4 (BRS MG 790 A) foi mais suscetível aos isolados UFU C38 (28,8) e UFU C40 (30,3), os quais obtiveram a maior AACPS (Tabela 3). Por ser um genótipo voltado para alimentação humana, de acordo com VIOLATTI e TEBALDI (2016), deve se ter uma preocupação maior, devido à falta de resistência como a determinados patógenos como *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. Esses dois isolados foram considerados menos agressivos para os demais genótipos avaliados, porém quando se tem a presença de um genótipo suscetível e condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento do patógeno, independentemente do nível de sua agressividade, a doença irá se manifestar e acometerá danos a planta. Este fator foi possível ser observar no genótipo G4 em BOD não acontecendo o mesmo em casa de vegetação, que por alguma interferência do ambiente, o patógeno não conseguiu expressar todo o seu potencial.

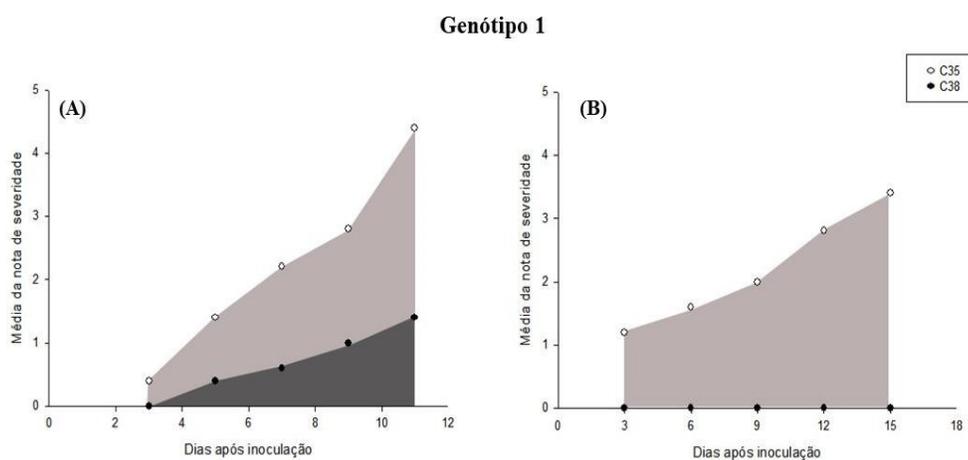
O isolado UFUC38 quando inoculado ao genótipo G1 padrão de resistência, obteve

(0,0) de AACPS (Tabela 3), não ocorrendo o desenvolvimento da doença, identificando a importância da utilização de um genótipo promissor quanto a resistência frente a bacteriose. Os isolados UFU C35 e UFU C37 não apresentaram diferenças entre genótipos quanto a agressividade, sendo o isolado bacteriano C35 o com maior AACPS.

Analisando os genótipos dentro de cada isolado, para a casa de vegetação os genótipos G1 e G4 possuíram maior AACPS para os isolados C35, C37 e C40, sendo os mais suscetíveis a doença quando comparado aos genótipos G2 e G3 que obtiveram a menor AACPS, onde o mesmo pode ser observado em BOD.

Com o cálculo da área abaixo da curva de progresso da severidade, selecionou-se o genótipo com padrão resistência para avaliar o comportamento de dois isolados UFU C35, com maior agressividade, e UFU C38, com menor agressividade (Figura 1). Quando o genótipo G1 foi inoculado com a bactéria UFU C35 obteve a maior área da curva de progresso da doença, tanto em casa de vegetação como em BOD. Quando o genótipo G1 foi inoculado com a bactéria UFU C38 o genótipo atingiu o menor progresso da severidade para ambos ambientes de avaliação. Esses resultados indicam que quando se tem um isolado mais agressivo, em um ambiente favorável ao seu desenvolvimento, mesmo com a presença de um genótipo resistente, a esta doença poderá ocorrer, ocasionando perdas e danos na cultura.

Figura 1 - Curva do progresso da pústula bacteriana da soja, dos isolado UFU C35 e UFU C38 em (A) Casa de vegetação e (B) ambiente controlado- BOD.



Os genótipos G1 e G4 apresentaram a maior AACPS para os isolados UFU C35, UFU C37 e UFU C40, sendo os mais suscetíveis a ocorrência da doença, tanto em casa de vegetação como em BOD.

Os resultados encontrados condizem com os de GORADIA et al. (2009), onde avaliaram as respostas da pústula bacteriana em 45 cultivares de soja, inoculados com o isolado ATCC 17915 de *X. axonopodis* pv. *glycines* e observaram diferentes níveis de severidade à pústula bacteriana.

Os genótipos avaliados apresentaram sintomas característicos da pústula bacteriana após a inoculação tanto em casa de vegetação, como em BOD para todos os isolados utilizados no experimento (Figura 2) e (Figura 3). Os sintomas identificados por ZINSOU et al. 2015, foram semelhantes ao do presente estudo, os quais iniciaram por manchas pequenas de coloração marrom, e com o progresso da doença, principalmente em genótipos suscetíveis, formaram-se intensos halos amarelos ao redor de áreas amarronzadas bem definidas, denominadas pústulas, característica marcante dessa doença.

Figura 2- Sintomas da pústula bacteriana em folhas de soja. (A) Casa de vegetação: Sintoma inicial da pústula bacteriana, com pequenas lesões de coloração marrom, com centro elevado e circundadas por um estreito halo amarelo; (B) BOD: Infecção severa, lesões com grande área marrom, necróticas e irregulares, com estreito halo amarelado. Fonte: Autora.

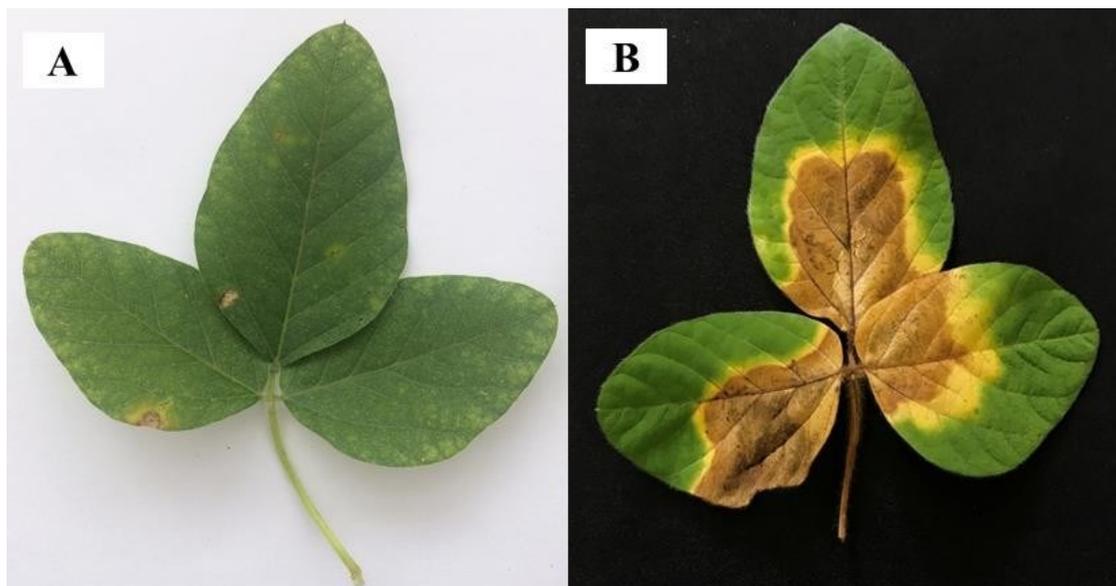
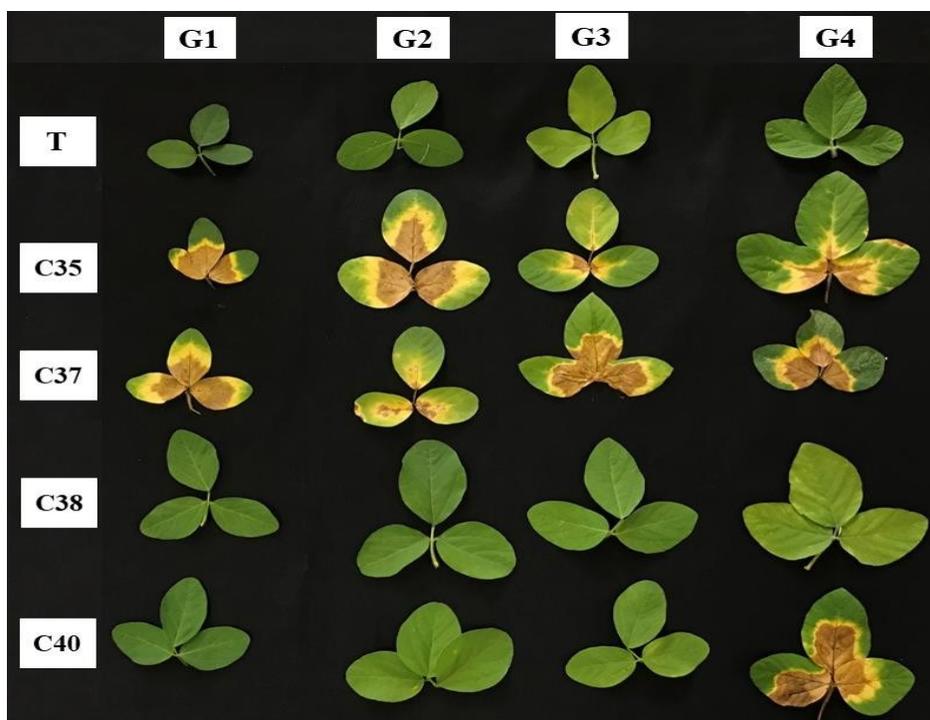


Figura 3 - Prancha trifólios de soja com sintomas da pústula bacteriana, experimento em BOD. (T) testemunha inoculada com água destilada sem sintomas; (C35, C37 e C40) isolados com maior agressividade; (C38) isolado menos agressivo, nos genótipos de soja (G1, G2, G3 e G4). Fonte: Autora.



Em experimentos realizados em mandioca, Cardoso et al. (2015), identificou que os isolados *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* apresentaram diferenças significativas quanto à agressividade, onde os materiais testados apresentaram variação quanto à severidade da doença para cada patógeno e material testados.

Em um estudo realizado em soja em Guiné e Benim, Zinsou et al. (2015), caracterizaram isolados de *Xanthomonas*, sendo os isolados UP-PK-S3 (75,9%) e THAI 12.2 (65,42%) apresentaram maior agressividade e os isolados maior agressividade e OUESSE (9,83%) com menor agressividade.

Segundo Nakatani et al. (2009) em estudo em maracujazeiro onde testou a agressividade dos isolados através da área foliar lesionada, obteve diferença estatística para todos isolados estudados, o qual indica a existência de variabilidade na agressividade dos isolados quando inoculados em maracujá azedo.

Acredita-se que a variação da agressividade dos isolados do presente estudo tenha

vido resultado da interação genótipo x ambiente, como foi proposto por Amorim (1995), o qual observou diferenças no comprimento do período latente podem estar associadas à variedade da espécie hospedeira, à raça do patógeno e ao ambiente.

3.2 *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*

A relação entre o maior e menor quadrado médio do resíduo (QMR) foi menor que sete (2,975) permitindo a utilização da Análise Conjunta. As pressuposições da ANOVA foram atendidas para o experimento (Estatística do teste de Levene = 0,011 e Estatística do teste de Kolmogorov-Smirnov = 0,091. A interação Genótipo x Isolado x Ambiente foi significativa a 1% de probabilidade pelo teste F, desdobrando-se a interação (Tabela 4).

Tabela 4. Quadro da análise de variância (ANOVA) para análise conjunta da área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) de dois isolados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em diferentes genótipos de soja avaliados em Casa de Vegetação e BOD.

Causas de variação	gl	QM	F
Local (L)	1	47,0	1,019
Genótipo (G)	3	605,0	13,081**
Isolado (I)	1	4523,0	97,761**
Repetição dentro de local	1	382,9	0,374
L*G	3	576,0	12,452**
L*I	1	1048,0	22,65**
G*I	3	96,0	2,074
L*G*I	3	306,0	6,610**
Resíduo	62	46,0	
Resíduo rep (local)	1	170,2	
Coeficiente de variação		39,54%	

gl: graus de liberdade.

Foi verificado que o isolado UFU C3 foi mais agressivo, no qual obteve uma AACPS maior que o isolado bacteriano UFU C41 (Tabela 5), com exceção do genótipo G2 e G4 em casa de vegetação, no qual não ocorreu diferença entre os isolados.

Tabela 5. Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) do crestamento bacteriano da soja, de isolados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em diferentes genótipos em casa de vegetação e BOD.

Casa de vegetação					BOD				
Isolado	Genótipo				Isolado	Genótipo			
	G1	G2	G3	G4		G1	G2	G3	G4
UFU C3	18,0 Ba	15,0 Aa	18,0 Ba	24,0 Aa	UFUC3	17,7 Ba	50,1 Bc	20,1 Ba	34,5 Bb
UFUC41	7,5 Aa	9,0 Aa	5,4 Aa	21,9 Ab	UFUC41	8,4 Aa	15,0 Aa	4,2 Aa	5,7 Aa

Médias seguidas por letras iguais, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Analisando os genótipos dentro de cada isolado em relação a resistência e suscetibilidade em casa de vegetação, apenas o genótipo G4 (padrão suscetibilidade, utilizado na alimentação humana) possuiu maior AACPS que os demais genótipos para o isolado UFU C41, fato este que pode ter acometido por alguns fatores, como ambientais os quais podem influenciar no ritmo de crescimento do patógeno, ou contaminação cruzada por outro patógeno presente na casa de vegetação, visto que o método de avaliação em BOD por se um ambiente controlado é mais confiável não ocorrendo variações que possam a vir interferir no experimento. Sendo que para o isolado UFU C3 não houve diferença entre os genótipos.

Em BOD, não ocorreu diferenças estatísticas entre os genótipos para o isolado bacteriano UFU C41. No qual, para o isolado UFU C3 os genótipos G1 e G3 foram os mais resistentes os quais apresentaram menores valores de AACPS, G4 foi moderadamente resistente, e G2 suscetível para esse isolado.

Foi observado que a casa de vegetação e BOD não apresentaram diferença na expressão da severidade da doença (Tabela 6), com exceção do isolado C3 no genótipo G2, em que a BOD proporcionou uma maior AACPS e do isolado C41 no genótipo G4, onde a casa de vegetação apresentou maior valor da AACPS.

Em casa de vegetação, os isolados UFU C41 e UFU C3 se diferenciaram estatisticamente apenas nos genótipos G1 e G3, porém, em BOD, os isolados foram divergentes em todos os genótipos avaliados, onde o isolado C3 foi mais agressivo que UFU C41.

Tabela 6. Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) do cretamento bacteriano da soja, para dois isolados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em quatro genótipos, em casa de vegetação e BOD.

	Ambiente	
	BOD	Casa de vegetação
	UFU C3	
G1	17,7 a	18,0 a
G2	50,1 b	15,0 a
G3	20,1 a	18,0 a
G4	34,5 a	24,0 a
	UFU C41	
G1	8,4 a	7,5 a
G2	15,0 a	9,0 a
G3	4,2 a	5,4 a
G4	5,7 a	21,9 b

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 0,05 de significância.

Os genótipos avaliados apresentaram sintomas característicos do cretamento bacteriano após a inoculação em ambos ambientes de avaliação (Figura 3) e (Figura 4). Os sintomas típicos identificados na maioria dos estudos realizados são a severa atrofia das plantas e a produção de amarelecimento clorótico sistêmico, onde a clorose e os sintomas notados são devidos a produção de uma ou várias toxinas, uma delas identificada como coronatina, ou também que existem diferenças relacionadas à concentração dessas toxinas, onde a mesma raça pode haver variações dessa concentração (SLEESMAN et al., 1971).

Figura 4 - Sintomas de cretamento bacteriano em folhas de soja. (A) e (B) Casa de vegetação: Sintoma inicial do cretamento bacteriano, com manchas marrons circundadas por um halo verde amarelado; (B) BOD: Infecção severa, encharcadas, com numerosas lesões marrom-escuras circundadas por um halo verde amarelado. Fonte: Autora.

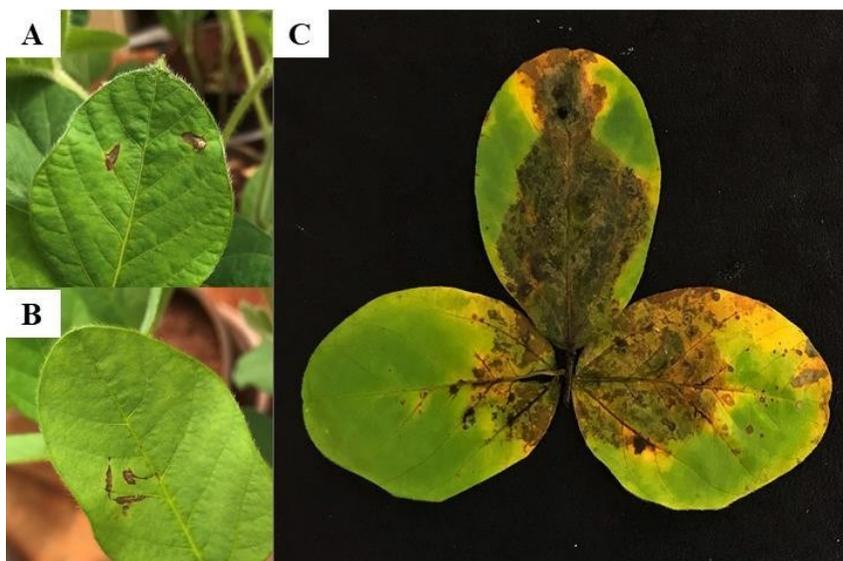


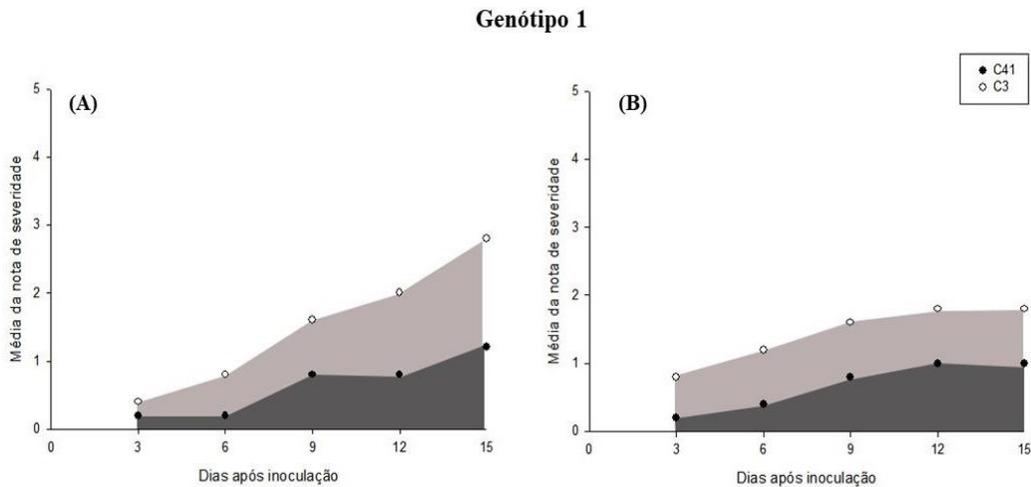
Figura 5 - Prancha trifólios de soja com sintomas de cretamento bacteriano, experimento em BOD. (T) testemunha inoculada com água destilada sem sintomas; (C3) isolados com maior agressividade, inoculados em quatro genótipos (G1, G2, G3 e G4). Fonte: Autora.



Para representar a diferença entre os isolados, foi selecionado dois isolados com maior e menor agressividade UFU C3 e UFU C41, respectivamente, afim de comparar a AACPS, os quais foram analisados no genótipo G1 padrão resistência do presente estudo (Figura 6).

Por meio da análise de severidade foi possível identificar diferenças quanto ao genótipo G1 inoculado com isolado UFU C3, o qual obteve maior severidade da doença e maior área abaixo da curva do progresso, à medida que eram feitas avaliações em função ao tempo, tanto em casa de vegetação quanto em ambiente controlado-BOD. Para o isolado UFU C41 quando inoculado no genótipo G1, esse apresentou menor severidade para ambos ambientes de avaliação, confirmando que este isolado quando comparado ao UFU C3 possui um nível de agressividade menor. Esses resultados indicam a diferença entre os isolados em relação a sua agressividade.

Figura 6. Avaliação da área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) para *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea*. (A) Casa de vegetação e (B) ambiente controlado-BOD. Isolados UFU C3 maior agressividade e UFU C41 menor agressividade.



Mingsheng et al. (2011), citam a existência de variabilidade dentro da espécie desse patógeno, com a ocorrência de diferentes raças e/ou estirpes, identificando a variação de virulência em relação a diferentes genótipos de soja e de outras espécies de plantas.

Long et al. (1985), verificaram que sob a alta pressão de inoculação nos experimentos, que somente quando as condições para a determinação da raça (folhagem, temperatura, umidade relativa) foram padronizados uma reação suscetível típica para a raça 10 foi obtido, mostrando então que pode haver equívoco para determinar a presença correta de uma raça em campo.

Cross et al. (1966) relataram que algumas cultivares tendem a ter resistência a altas temperaturas (27 °C), mas com suscetibilidade a baixas temperaturas (15 °C a 21 °C), problematizando ainda mais as avaliações dos resultados.

De forma geral, casa de vegetação e BOD não apresentaram diferença na expressão da severidade da doença, com exceção do isolado UFU C3 no genótipo G2, em que a BOD proporcionou uma maior AACPS e do isolado UFU C41 no genótipo G4, onde a casa de vegetação apresentou maior valor da AACPS.

4 CONCLUSÕES

A técnica aplicada pode ser utilizada como uma ferramenta eficiente, rápida e barata para a diferenciação de agressividade de espécies bacterianas.

Os sintomas apresentados pelas plantas foram típicos da pústula bacteriana e crestamento bacteriano.

O isolado UFU C35 de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* foi o selecionado como o isolado mais agressivo em ambos ambientes de avaliação, sendo os isolados UFU C37 e C40 apresentaram níveis de agressividade consideráveis.

O isolado UFU C3 de *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea* foi o mais agressivo em ambos ambientes de avaliação.

De forma geral, a casa de vegetação e BOD, poucas diferenças foram encontradas na expressão da severidade da doença para *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea*.

REFERÊNCIAS

- ACCO, L.F.; GOMES, D.G.; MATOS, J.N.; RIBEIRO, N.R.; BALBI-PEÑA, M.I. Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da pústula bacteriana em soja. **Summa Phytopathologica**, Londrina-PR, v.46, n.2, p.145-149, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/211476>
- AMORIM, L. Colonização e reprodução. In: Bergamin Filho, A, Kimati, H. e Amorim, L. (Eds). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3.ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, v.1,1995, p.309-324.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de Fitopatologia**. 5ª Ed. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 2018, p.518.
- BASU, P.K.; BUTLER, G. An evaluation of soybean bacterial blight assessment methods. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v.8, p.459-463, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060668609501788>
- BONALDO, S. M.; RIEDO, I. C.; LIMA, A. R. Monitoramento e diagnóstico de doenças foliares da cultura da soja na região da COMCAM na safra de 2007/2008. **Campo Digital**, Campo Mourão, v. 4, n. 1, p. 127-136, 2009.
- BONDARCZUK, K.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. **Cell Biology Toxicology**, [s.l.], v.29, n. 6, p. 397-405, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10565-013-9262-1>
- CASTRO, L. S.; MIRANDA, M. H.; LIMA, J. E. Indicadores sociais de desenvolvimento e a produção de soja: uma análise multivariada nos 150 maiores municípios produtores brasileiros. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, Taubaté, v. 11, n. 1, p. 69-87, 2015.
- CROSS, .1. E., B. W. KENNEDY, J. W. LAMBERT, R. L. COOPER. Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. **Plant Dis**, [s.l.], v.50, p.557-560, 1966.
- DAMICONE, J. Bacterial blight outbreak on soybeans. **Pest Alerts**, v.8, n.27, p. 1-4, 2009.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA NA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Seleção de linhagens de soja da Embrapa para resistência a doenças: histórico de 2008 a 2014**. Londrina: Embrapa Soja, 2016. 41 p.: il.;
- FIALLOS, F. R. G. A ferrugem asiática da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi* Sydow e Sydow. **Ciência e Tecnologia**, Jabotical, v. 4, n. 2, p. 45-60, 2011. DOI: <https://doi.org/10.18779/cyt.v4i2.70>

GOMES, F.P.; GARCIA, C.H. Análise de grupos de experimentos. In: Gomes, F.P.e Garcia, C.H. **Estatística aplicada a experimentos agrônômicos e florestais**: exposição com exemplos e orientações para uso de aplicativos. Piracicaba: FEALQ, 2002, p. 169-192.

GORADIA, L.; HARTMAN, G.L.; DANIEL, S.L. Evaluation of glyphosate-tolerant soybean cultivars for resistance to bacterial pustule. **European Journal of plant Pathology**, [s.l.], v.124, p. 331-335, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9410-2>

GOULART, A.C.P. **Fungos em sementes de soja**: detecção e importância. Dourados: EMBRAPA-CPAO, 1997. 58p. (EMBRAPA-CPAO. Documentos, 11).

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., US, v. 60, p. 969- 976. 1970. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-60-969>

KING, E. O.; WARD, M. K. AND RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. and Med.*, [s.l.], v.44, p.301-307, 1954.

LANNA FILHO, R. Fitobactérias na cultura da soja. In: LEMES, E.; CASTRO, L.; ASSIS, R. **Doenças da soja**: melhoramento genético e técnicas de manejo. Campinas: Millennium, 2015, p. 81-92.

LONG, M. P.; BARTON-WILLIS, B. J.; STASKAWICZ, D.; DAHLBECK, N. T.; KEEN. Further studies on the relationship between glyceollin accumulation and the resistance of soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Phytopathology**, [s.l.], v.75, p.235-239, 1985. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200009>

MARCUZZO, L.L.; BECKER, W.F.; FERNANDES, J.M.C. Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de Caçador/SC. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.35, n.2, p.132-135, 2009.

McKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal Agricultural Research**, Washington, DC, v. 26, n. 5, p. 195-219, Nov. 1923.

MINGSHENG Q.I.; WANG D.; BRADLEY C.A.; ZHAO, Y. Genome Sequence Analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and Subtractive Hybridization-Based Comparative Genomics with Nine *Pseudomonads*. **PLoS ONE**, Estados Unidos, v.6, n.1, p. 16451, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016451>

PORTZ, L. R.; KUHN, O. J.; FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R. Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.28, n.3, p.413-419, 2006. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v28i3.965>

SCORTICHINI, M.; MARCELLETTI, S.; FERRANTE, P.; PETRICCIONE, M. e FIRRAO, G. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic

pathogen. **Molecular plant pathology**, Roma- Italia, v.13, n.7, p.631–640, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2012.00788.x>

SLEESMAN, J.P., C. LEBEN, A.F. SCHMITTHENNER, AND E. COYLE. 1969. Relation of *Pseudomonas glycinea* to systemic toxemia in soybean seedlings. **Phytopathology**, [s.l.], v.59, p.1970, 1971.

YORINORI, J.T.; YUYAMA, M.M.; SIQUERI, F.V.; ARAÚJO JÚNIOR, I.P. **Doenças na soja**. In: Boletim de Pesquisa 2015/2016 (ed.). Santa Cruz do Sul: Gazeta, 2015. p. 310-393.

ZINSOU, V.A.; AFOUDA, L.A.C.; ZOUMAROU-WALLIS, N.; PATE-BATA, T.; DOSSOU, L.; GOTZ, M.; WINTER, S. Occurrence and characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, causing bacterial pustules on soybean in Guinea Savanna of Benin. **African Crop Science Journal**, Savana, v.23, p.203-210, 2015.

CAPÍTULO 2

RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* EM
CÂMARA DE CRESCIMENTO.

RESUMO

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Resistência de genótipos de soja a *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em câmara de crescimento**. 2021. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

Entre as doenças relatadas na literatura, a pústula bacteriana é uma das principais que afetam a cultura da soja. A qual provoca perdas expressivas em lavouras comerciais, principalmente em regiões úmidas e com temperaturas superiores a 30°C, sendo uma doença que se manifesta em toda a parte área da planta, afetando, caule, folhas e vagens. O presente trabalho teve como objetivo avaliar e selecionar genótipos de soja com resistência à bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) e no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Foram utilizados trinta genótipos pertencentes ao Banco de Germoplasma da instituição, cinco comerciais e cinco genótipos destinados a alimentação humana. Foi realizado a seleção dos melhores trifólios os quais foram inoculados com o isolado bacteriano UFU C35, padrão de agressividade, e assim armazenados em caixa GERBOX e mantidos em câmara de crescimento a 30°C. O ensaio foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 40 genótipos e cinco repetições, totalizando 200 parcelas experimentais. O isolado bacteriano UFU 35 foi identificado por meio de características culturais, bioquímicas, moleculares e de patogenicidade em plantas de soja. A severidade da doença foi avaliada, usando uma escala de notas variando de 0 a 5, em cinco avaliações e calculando a AACPS, sendo submetida à análise de variância a 0,01 de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância por meio do programa estatístico R versão 4.0.0. Os genótipos apresentaram variabilidade com relação à resistência, sendo que os genótipos G2 (usado para alimentação humana), G14 e G15 (pertencentes ao LAGER) foram considerados resistentes e os genótipos UFU G5 (usado para alimentação humana), e G27 (pertencentes ao LAGER) foram os mais suscetíveis.

Palavras-chave: AACPS. *Glycine max*. Inoculação. Pústula Bacteriana. Suscetibilidade.

¹Comitê Orientador: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

ABSTRACT

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Resistance of soybean genotypes to *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* in growth chamber.** 2021. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytotechnics) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia.¹

Among the diseases reported in the literature, bacterial pustule is considered as one of the main ones affecting soybean crop, causing significant losses in commercial crops, especially in humid regions and with temperatures higher than 30°C, being a disease that manifests itself in every part of the plant area, affecting, stem, leaves and pods. The objective of this work was to evaluate and select soybean genotypes with resistance to the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines*. The experiment was conducted in a greenhouse of the Institute of Agricultural Sciences (ICIAG) and in the Laboratory of Plant Bacteriology of the Federal University of Uberlândia (UFU). Thirty genotypes belonging to the germplasm bank of the institution, five commercial and five genotypes intended for human feeding were used. The best trifoliums were inoculated with the bacterial isolate UFU C35, aggressiveness pattern, and thus stored in gerbox box and kept in a growth chamber at 30°C. The assay was carried out in a completely randomized design with 40 genotypes and five replications, totaling 200 experimental plots. The bacterial isolate UFU 35 was identified by cultural, biochemical, molecular and pathogenicity characteristics in soybean plants. The severity of the disease was calculated in five evaluations, using a scale of scores ranging from 0 to 5, the AACPS was submitted to variance analysis to 0.01 of significance and the means were compared by the Scott-Knott test to 5 % significance through the statistical program R version 4.0.0. The bacterial isolate was identified as *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*. The genotypes showed variability in relation to resistance, and genotypes G2, G14 and G15 were considered resistant and genotypes UFU G5 and UFU G27 were the ones with the highest susceptibility levels.

Keywords: AACPS. Glycine max. Inoculation. Bacterial pustule. Susceptibility.

¹Steering Committee: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

1 INTRODUÇÃO

A redução de produtividade por área cultivada de soja no Brasil, pode ser explicada por diversos fatores, dentre eles, os nutricionais, densidade de plantio, sementes não certificadas, agrometeorológicos, sistemas de condução inadequados e, também, por problemas fitossanitários que aumentaram com a expansão da cultura, em especial as doenças (HE et al., 2020).

As doenças são fatores limitantes para o cultivo da sojicultora, uma vez que a maioria, quando não controlada eficientemente, causa danos irreparáveis, acarretando em prejuízos altíssimos para o produtor (BOARD; KAHLON, 2011).

Entre as doenças relatadas na literatura, a pústula bacteriana causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, é considerada como uma das principais doenças bacterianas no cultivo da soja, quando presente em campo sob condições de clima quente e úmido, provoca perdas expressivas da parte aérea da cultura, que resultam em desfolha prematura, ocasionando a redução do número e tamanho dos grãos (WOLF, 1924).

A fitopatogenicidade de *Xanthomonas* é um fenômeno complexo que compreende várias fases, iniciando pela penetração na planta via ferimentos e aberturas naturais, uma vez inserida na planta, começa a se multiplicar nos espaços intercelulares, resultando na hipertrofia e hiperplasia celular, fato este associado ao surgimento da aparência de encharcamento e aumento da permeabilidade celular vegetal (SAIN; GOUR, 2013).

A fitobactéria possui pelo menos três raças fisiológicas descritas (PRATHUANGWONG; CHOETHANA, 1998) porém, no Brasil não se sabe qual é a mais prevalectada nas áreas produtoras. O principal método de controle dessa bacteriose é a utilização de cultivares resistentes, onde em busca de resistência foi descoberto que a cultivar CNS era imune a doença em condições de campo (HARTWIG; LEHMAN 1951).

A identificação desse fato permitiu a descoberta do gene recessivo *rxp* como fonte de resistência à pústula bacteriana. A manutenção desse gene constante na utilização nas cultivares de soja, afim de garantir o controle da doença. Não obstante a utilização desse gene não tem sido efetivo em reduzir os danos causados pela doença na produtividade da soja (WRATHER et al., 2006). A interação genótipo versus raça, é uma das principais

causas para a ineficiência da utilização desse gene, em virtude que essa interação confere uma alteração no fenótipo de reação à resistência.

Sendo assim, o presente trabalho possuiu como objetivo a avaliação da resistência de genótipos de soja a *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, afim obter genótipos com resistência à essa bactéria.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em Casa de Vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia – MG, com coordenadas geográficas 18° 53' 4.967" S e 48° 15' 36.788" O, durante os meses de abril e julho de 2019.

O material genético semeado foi constituído de genótipos promissores (Tabela 1), pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético do Laboratório de Germoplasma da UFU (LAGER/UFU) – *Campus* Umuarama, além dos genótipos comerciais e genótipos utilizados na alimentação humana, cedidos pela empresa Nutrialy Indústria e Comércio®, situada em Uberlândia, MG, que é uma indústria alimentícia que atua com a micronização da soja para a alimentação humana.

As plantas foram cultivadas em bandejas de 72 células com profundidade de 75mm, contendo substrato solo, areia e húmus na proporção de (4:1:1), em ambiente de casa de vegetação, em temperaturas entre 23 °C a 25 °C, sempre mantendo as condições de umidade do solo próximas as capacidades de campo.

Quando as plantas apresentaram de três a quatro trifólios (aproximadamente 15 dias após a semeadura), foram mantidas em câmara úmida por 24 h para a abertura dos estômatos. Após isso foi realizado a seleção dos melhores trifólios os quais foram destacadas e levados para o laboratório para a realização da inoculação.

O isolado bacteriano UFU C35 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*), foi selecionado para a realização deste experimento, o qual foi recuperado e multiplicado em meio de cultura 523 (KADO e HESKETT, 1970) por 24-48 horas a 28 °C. A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada autoclavada, ajustada em espectrofotômetro para $OD_{550} = 0,5$, correspondendo aproximadamente a 1×10^9 UFC mL⁻¹ (MARCUIZZO et al., 2009). Os trifólios foram colocados em bandejas com papel toalha, afim de evitar o encharcamento das folhas e foram submetidos a inoculação da suspensão bacteriana via pulverização com a adição de uma gota do Tween, sendo as testemunhas, pulverizadas com água destilada. Foi adicionado uma testemunha pulverizadas com água destilada, considerada como caráter de controle de eficiência da inoculação, e portando não sendo utilizada na análise estatística.

Tabela 1. Reação de genótipos se soja à *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*

Sigla	Genótipo	Origem
G1	UFU TN 105 AP	Nutrialy
G2	STWART	Nutrialy
G3	EMBRAPA 48	Nutrialy
G4	BRS MG 790 A	Nutrialy
G5	BRS 257	Nutrialy
G6	BR 860 75G1 RR	Comercial
G7	NIDERA 7255	Comercial
G8	TMG 7063	Comercial
G9	BRS LUZIANA RR	Comercial
G10	BRY 08 101 86	Comercial
G11	UFU L 02	LAGER/UFU
G12	UFU L 98	LAGER/UFU
G13	UFU L 526	LAGER/UFU
G14	UFU L 196	LAGER/UFU
G15	UFU L 586	LAGER/UFU
G16	UFU L 528	LAGER/UFU
G17	UFU L 90	LAGER/UFU
G18	UFU L 112	LAGER/UFU
G19	UFU L 10	LAGER/UFU
G20	UFU L 72	LAGER/UFU
G21	UFU L 263	LAGER/UFU
G22	UFU L 176	LAGER/UFU
G23	UFU L 159	LAGER/UFU
G24	UFU L 590	LAGER/UFU
G25	UFU L 71	LAGER/UFU
G26	UFU L 246	LAGER/UFU
G27	UFU L 525	LAGER/UFU
G28	UFU L 14	LAGER/UFU
G29	UFU L 258	LAGER/UFU
G30	UFU L 70	LAGER/UFU
G31	UFU L 69	LAGER/UFU
G32	UFU L 07	LAGER/UFU
G33	UFU L 538	LAGER/UFU
G34	UFU L 173	LAGER/UFU
G35	UFU L 214	LAGER/UFU
G36	UFU L 469	LAGER/UFU
G37	UFU L 298	LAGER/UFU
G38	UFU L 88	LAGER/UFU
G39	UFU L 105	LAGER/UFU
G40	UFU L 200	LAGER/UFU

Os trifólios inoculados foram distribuídos em caixas plásticas do tipo GERBOX[®] com papel filtro umedecido com água destilada e com uma estrutura suspensa para não se ter o contato trifólios com o papel e armazenados em câmara de crescimento-BOD a 30 °C. No interior da BOD foi colocado um béquer de 1 L contendo água para manter as condições de umidade, ideal para o desenvolvimento da bactéria. O ensaio foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com quarenta genótipos e cinco repetições, totalizando 200 parcelas experimentais.

A severidade da pústula bacteriana foi avaliada aos três, seis, nove, doze e quinze dias após a inoculação, usando uma escala diagramática modificada, descrita por Basu e Butler (1986), com notas variando de 0 a 5 onde: 0 = folha sem sintoma, 1 = de 1 a 4,9% da folha lesionada, 2 = de 5 a 19,9% da folha lesionada, 3 = de 20% a 39,9% da folha lesionada, 4 = de 40 a 74,9% da folha lesionada e 5 = acima de 75% da folha lesionada

Com as notas de severidade, foi calculado a Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) pela fórmula:

$$AACPS = \sum ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) (t_{i+1} - t_i) \text{ onde:}$$

Y representa a intensidade da doença,

t o tempo,

i o número de avaliações no tempo (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Os genótipos foram classificados como: resistentes (R), quando receberam nota 1; altamente resistentes (AR), com nota 2; moderadamente resistentes (MR), com nota 3; pouco resistentes (PR), com nota 4 e suscetíveis (S) para nota 5. A classificação foi baseada de acordo com GORADIA et al. (2009) para *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

Estimou-se a AACPS em até 9,0 para considera-los como altamente resistentes (AR), entre 9,1 e 18,0 para considera-los como moderadamente resistentes (R), entre 18,1 e 27,0 para considera-los como moderadamente resistente (MR), maior que 27,1 para considera-los como suscetíveis (S).

Foi ajustado a técnica dos Mínimos Quadrados Generalizados (Generalized Least Squares, GLS) após o atendimento da pressuposição de normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 0,05 de significância.

Para o modelo, foi criado um parâmetro de variação para cada genótipo para modelar a alta variância dos dados. O ajuste foi realizado pelo método Restricted

Maximum Likelihood (REML) e ajustado para 5000 iterações para o algoritmo de otimização e com o método de otimização SANN (Belisle, 1992). A AACPS foi submetida à análise de variância a 0,01 de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância por meio do programa estatístico R versão 4.0.0.

2.1 Teste de patogenicidade no hospedeiro e reação de hipersensibilidade

Plantas de soja, cultivar BRS 257 790 A, foram semeadas em vasos plásticos de 500 g contendo substrato solo, areia e húmus na proporção de (4:1:1), com 2 plantas por vaso. Aproximadamente 15 dias após a semeadura, quando as plantas apresentavam de três a quatro trifólios, com auxílio de uma seringa, realizou-se inoculação da suspensão bacteriana, e para a reação de hipersensibilidade, a inoculação em folhas de fumo. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 horas antes e após a inoculação.

A partir do aparecimento dos sintomas (lesões encharcadas e de coloração verde-amarela) foi realizado reisolamento da bactéria.

O isolamento da bactéria foi realizado a partir de folhas de soja com os sintomas de lesões encharcadas. Onde fragmentos foliares foram descontaminados com álcool 50% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos e posterior lavagem em água destilada esterilizada, os quais foram colocados em placa de Petri contendo o meio de cultura 523, e incubados na estufa a 28 °C por 48 horas. Os isolados foram preservados e mantidos na coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia do ICIAG/UFU.

2.2 Caracterização cultural, bioquímica e fisiológica

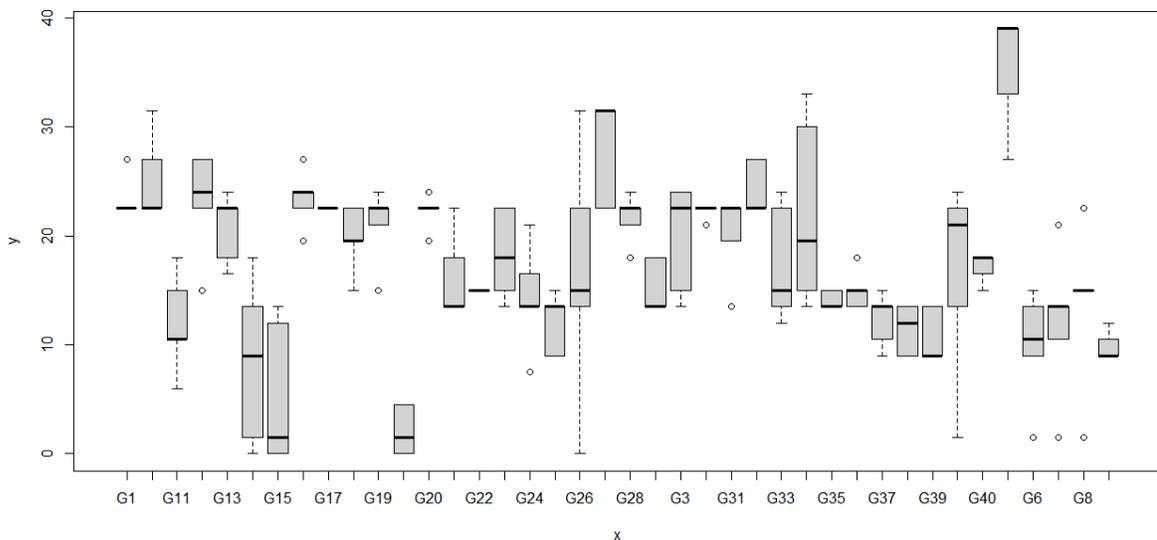
As colônias suspeitas foram repicadas e cultivadas para o meio 523 e caracterizados cultural, bioquímica e fisiologicamente pelos testes de: Gram, Oxidação/Fermentação, YDC, motilidade, produção de ácidos a partir da glicose de inositol, sorbitol, sacarose e D-arabinose, pela produção das enzimas arginina dihidrolase, liquefação da gelatina, oxidase, catalase e crescimento a 37 °C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a classificação dos genótipos, estimou-se a AACPS em até 9,0 para considerá-los como altamente resistentes (AR), entre 9,1 e 18,0 para considerá-los como moderadamente resistentes (R), entre 18,1 e 27,0 para considerá-los como moderadamente resistente (MR), maior que 27,1 para considerá-los como suscetíveis (S).

Pela alta heterogeneidade de variâncias presente nos dados, justificado pelas altas diferenças entre os genótipos, onde genótipos resistentes tendem a possuir menor variabilidade entre as repetições e genótipos suscetíveis maiores (Figura 1), foi ajustado a técnica dos Mínimos Quadrados Generalizados (Generalized Least Squares, GLS) após o atendimento da pressuposição de normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 0,05 de significância.

Figura 1. Teste de box plot para a área abaixo da curva de progresso da severidade da pústula bacteriana, dos 40 genótipos avaliados.



A análise de variância obtida pelo método dos Mínimos Quadrados Generalizados detectou diferenças significativas para os genótipos avaliados (p -valor $<0,001$). Pela técnica de agrupamento de Scott-Knott, observou-se a diferença entre os genótipos que foram classificados em 31 grupos distintos (Tabela 2).

Tabela 2. Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *Glycines* em diferentes genótipos em BOD.

Genótipo	Média da AACPS	Classificação
BRS 257 (G5)	35.4 a	S
UFU L 525 (G27)	27.9 b	S
BRY 08 101 86 (G10)	25.2 c	MR
UFU L 07 (G32)	24.3 d	MR
UFU TN 105 AP (G1)	23.4 e	MR
UFU L 528 (G16)	23.4 e	MR
UFU L 98 (G12)	23.1 f	MR
UFU L 90 (G17)	22.5 g	MR
UFU L 72 (G20)	22.2 h	MR
UFU L 70 (G30)	22.2 h	MR
UFU L 173 (G34)	22.2 h	MR
UFU L 14 (G28)	21.6 i	MR
UFU L 10 (G19)	21.0 j	MR
UFU L 526 (G13)	20.7 k	MR
UFU L 69 (G31)	20.1 l	MR
UFU L 112 (G18)	19.8 m	MR
EMBRAPA 48 (G3)	19.8 m	MR
UFU L 159 (G23)	18.3 n	MR
UFU L 538 (G33)	17.4 o	R
UFU L 200 (G40)	17.1 p	R
UFU L 246 (G26)	16.5 q	R
BRS MG 790 A (G4)	16.5 q	R
UFU L 263 (G21)	16.2 r	R
UFU L 258 (G29)	15.3 s	R
UFU L 176 (G22)	15 t	R
UFU L 469 (G36)	15 t	R
UFU L 590 (G24)	14.4 u	R
UFU L 214 (G35)	14.1 v	R
TMG 7063 (G8)	13.8 w	R
UFU L 298 (G37)	12.3 x	R
UFU L 02 (G11)	12 y	R
UFU L 71 (G25)	12 y	R
NIDERA 7255 (G7)	12 y	R
UFU L 88 (G38)	11.4 z	R
UFU L 105 (G39)	10.8 a1	R
BR 860 75G1 RR (G6)	9.9 b1	R
BRS LUZIANA RR (G9)	9.9 b1	R
UFU L 196 (G14)	8.4 c1	AR
UFU L 586 (G15)	5.4 d1	AR
STWART (G2)	2.1 e1	AR

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna não diferem entre si pelo método de agrupamento de Scott-Knott. Altamente Resistentes (AR); Resistentes (R); Moderadamente Resistentes (MR) e Suscetíveis (S).

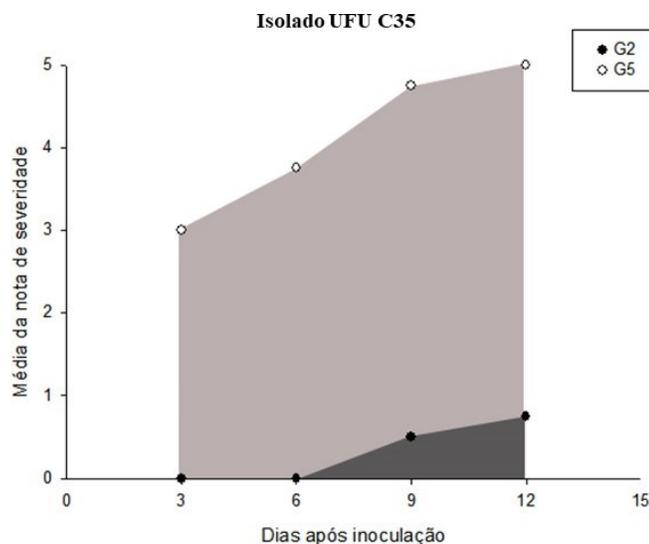
Esses resultados indicam reação diferencial entre os cultivares, o que evidencia a existência de variabilidade genética nos genótipos avaliados, no qual o estudo mostra a importância de conhecer a reação de resistência de genótipos de soja à doença pústula-bacteriana, visto a necessidade de obtenção de fontes de resistência à mesma.

Os genótipos foram classificados em 31 grupos, onde dos 40 genótipos avaliados, dois genótipos foram classificados como suscetíveis (5%), 16 genótipos moderadamente suscetíveis (40%), 19 genótipos moderadamente resistentes (47,5%) e três genótipos altamente resistentes (7,5%).

Segundo Zinsou et al., (2015), identificaram a presença da pústula bacteriana em soja em 33 locais dos 34 de pesquisa em Guiné na África, no qual a bacteriose foi dividida em quatro classes de severidade, onde os valores para severidade variaram de 5,95 a 26,14% e para a incidência 70 a 15,8 %, sendo que nos locais avaliados os autores identificaram um isolado com 75,9 % de severidade, onde relatam que a diversidade observada na reação da doença pode ser devido às variedades de soja suscetíveis à pústula bacteriana ou o ambiente favorável para o desenvolvimento da doença permitindo a bacteriose expressar seu máximo potencial de virulência.

A curva de progresso da pústula bacteriana da soja (Figura 2) mostra a diferença entre os genótipos G5 (BRS 257) e G2 (STWART) inoculados com o isolado UFU C35, onde a AACPS variou de 34,4 Genótipo G5 (BRS 257) considerado suscetível a 2,1 Genótipo G2 (STWART) considerado altamente resistente onde houve uma menor curva do progresso da doença, indicando ser um genótipo promissor para o uso em Programas de Melhoramento Genético.

Figura 2 - Curva de progresso da pústula bacteriana da soja, para os genótipos G5 (BRS 257) e G2 (STWART). Eixo Y = Severidade (nota); X= Dias após a inoculação.



Em estudos na cultura do feijão, onde Ribeiro et al. (2017) avaliaram 58 linhagens em relação a resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e encontraram 31 linhagens suscetíveis, 21 moderadamente suscetíveis e 6 resistentes.

Em relação aos níveis de suscetibilidade (S) e moderadamente resistentes (MR), 14 genótipos do programa de melhoramento da LAGER/UFU foram classificados nesse grupo, 1 genótipo comercial e 2 genótipos Nutrially utilizados para alimentação humana. Esses resultados corroboram com dados que indicam que as cultivares de soja desenvolvidas para serem utilizadas na alimentação humana não possuem resistência às bacterioses, principalmente a *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* (VIOLATI; TEBALDI, 2016).

Em relação ao agrupamento de resistência (R) foram identificados 14 genótipos pertencentes ao LAGER/UFU, 4 genótipos comerciais e 1 genótipos Nutrially. Para os genótipos caracterizados como altamente resistentes (AR) foram 2 genótipos LAGER/UFU e 1 genótipos Nutrially, voltamos para a alimentação humana, resultados que demonstram que as cultivares de soja avaliadas apresentam determinados mecanismos de resistência que dificultam ou impedem a colonização da bacteriose.

Esses resultados podem auxiliar os programas de melhoramento genético, visto a falta de estudos e pesquisas conclusivas para a resistência e controle dessa bacteriose nos

plantios em todo o país. Onde a principal ferramenta para o controle a essa bacteriose é a utilização de cultivares resistentes, devido não possuir produtos químicos recomendados.

Além disso, o conhecimento dos grupos de genótipos resistentes e moderadamente resistentes, sugerem o cruzamento visando a piramidação de genes de resistência o que favorece estratégias para programas de melhoramento.

A natureza do controle genético da resistência à *X. axonopodis* pv. *glycines* foi inicialmente creditada a apenas um gene recessivo *rxp* (BERNARD; WEISS, 1973; HARTWIG; LEHMAN, 1951), que confere resistência vertical às cultivares de soja. Este gene foi identificado no cruzamento do genótipo de soja CNS (resistente) com genótipos suscetíveis. Outras fontes de resistência, contudo, vêm sendo também estudadas (CHATNAPARAT et al., 2016; HARTWIG; LEHMAN, 1951), devido a reações quantitativas intermediárias de resistência, ou suscetibilidade, que já foram observadas (SOARES; ARIAS, 2016).

A utilização constante de um mesmo genótipo resistente a essa doença pode propiciar o aumento populacional dessa fitobactéria e surgir resistência natural a ela, portanto, deve-se ter atenção quanto as enfermidades bacterianas, pois as práticas de manejo são laboriosas e controle químico é ineficiente.

De acordo com Souza e Maringoni (2008), os genótipos que são resistentes envolvem o patógeno através de projeções protoplasmáticas, o qual impedem sua penetração dos vasos do xilema, onde que para os genótipos suscetíveis o transporte de água é obstruído devido à presença de células bacterianas, o que comprometem a planta e o surgimento aos sintomas da doença, como o amarelecimento, e subsequente a morte da planta, principalmente por observar diferentes níveis de agressividade do patógeno.

Os isolados bacterianos detectados nos trifólios, foram caracterizados cultural, bioquímica e fisiologicamente como: Gram negativo, oxidação/fermentação: aeróbia estrita; com colônias mucóides, convexas, brilhantes, de coloração amarela em meio de cultura 523 e YDC, asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio negativo, reação de hipersensibilidade em fumo e patogenicidade no hospedeiro positivos, caracterizando os isolados como *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

O conhecimento desses genótipos quanto à pústula bacteriana é de extrema

importância para a cultura da soja, haja vista a carência de cultivares resistentes no setor produtivo e conhecimento da variabilidade do patógeno.

4 CONCLUSÕES

A maioria dos genótipos avaliados apresentam níveis diferentes de resistência à *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*.

O genótipo G5 (BRS 257) utilizado com finalidade para a alimentação humana e G27 (UFU L 525), foram classificados como suscetíveis à pústula bacteriana em soja.

Os genótipos G2 (STWART), G14 (UFU L 196) e G15 (UFU L 586) foram agrupados como altamente resistentes, indicam uma importante fonte de resistência à pústula bacteriana em soja.

REFERÊNCIAS

- BASU, P.K.; BUTLER, G. An evaluation of soybean bacterial blight assessment methods. **Canadian Journal of Plant Pathology**, [s.l.], v.8, p.459-463, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060668609501788>
- BELISLE, C. J. P. Convergence theorems for a class of simulated annealing algorithms on Rd. **Journal of Applied Probability**, v.29, p.885–895, 1992. DOI: [10.2307/3214721](https://doi.org/10.2307/3214721).
- BERNARD, R.L.; WEISS, M.G. Qualitative genetics. In: Caldwell, B.E. (ed.) Soybeans: improvement, production, and uses. **American Society of Agronomy**, Madison, p. 117-154, 1973.
- BOARD, J. E.; KAHN, C. S. Soybean yield formation: what controls it and how it can be improved. In: EL-SHEMY, H. A. **Soybean physiology and biochemistry**. Croatia: InTech, 2011. p. 1-36
- CHATNAPARAT, T.; PRATHUANGWONG, S.; LINDOW, S.E. Global pattern of gene expression of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* within soybean leaves. **Mol Plant Microbe Interact.** [s.l.], v. 29, p.508-522, 2016. DOI: [10.1094/MPMI-01-16-0007-R](https://doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0007-R)
- GORADIA, L.; HARTMAN, G.L.; DANIEL, S.L. Evaluation of glyphosate-tolerant soybean cultivars for resistance to bacterial pustule. **European Journal of plant Pathology**, [s.l.], v.124, p. 331-335, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9410-2>
- HARTWIG, E. E.; LEHMAN, S. G. Inheritance of resistance to bacterial pustule disease in Soybeans. **Agronomy Journal**, v.43, p. 226-229, 1951. DOI: <https://doi.org/10.2134/agronj1951.00021962004300050005x>
- HE, L.; JIN, N.; YU, Q. Impacts of climate change and crop management practices on soybean phenology changes in China. **Science of The Total Environment**, China, v. 707, p. 135638, 2020. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.135638](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135638)
- KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, Minn., US, v. 60, p. 969- 976. 1970.
- LANNA-FILHO, R. Fitobactérias na cultura da soja. In: Lemes, E. M.; Castro, L.H. S.; Assis, R. T. (org.). **Doenças da soja: melhoramento genético e técnica de manejo**. Campinas: Millennium, 2015. pp. 83-92.
- MARCUZZO, L.L.; BECKER, W.F.; FERNANDES, J.M.C. Alguns aspectos epidemiológicos da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro na região de

- Caçador/SC. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v.35, n.2, p.132-135, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052009000200009>
- PRATHUANGWONG, S.; CHOETHANA, P. Pathogenicity variation of some Thais isolates of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. **Kasetsart Journal: Natural Science**, [s.l.], 32 (4), p. 529-37, 1998.
- RIBEIRO, T; AZEVEDO, C.V.G; ESTEVES, J.A.F; CARBONELL, S.A.M; ITO, M.F; CHIORATO, A.F. Reaction of common bean lines to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Campinas, v.17, p. 40-46, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332017v17n1a6>
- SAIN, S. K.; GOUR, H.N. Pathological and physio-biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, incitant of Glycine max leaf pustules. **Indian Phytopathology**, [s.l.], v.66, n.91, p. 20-7, 2013.
- SOARES, R. M.; ARIAS, C. A. Seleção de linhagens de soja da Embrapa para resistência a doenças: histórico de 2008 a 2014. **Embrapa Soja**, Londrina, 2016.
- SOUZA V.L., MARINGONI A.C. Análise ultraestrutural da interação de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* em genótipos de feijoeiro. **Summa Phytopathologica** v.34, p.318-320, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000400003>
- VIOLATTI, M. R.; TEBALDI, N. D. Detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines* em sementes de soja. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 42, p. 268-270, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2127>
- WOLF, F.A.; Bacterial pustule of soybean. **Journal of Agriculture Research**, 29, pp. 57-68. 1924.
- WRATHER, A. *et al.* Effect of diseases on soybean yield in the top eight producing countries in 2006. *In: Plant Health Progress*, p.125, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHP-2010-0102-01-RS>
- WRATHER, J. A.; KOENNING, S.R. Estimates of disease effects on soybean yields in the United States, 2003-2005. **Journal of Nematology**, v. 38, p. 173-180, 2006.
- ZINSOU, V.A.; AFOUDA, L.A.C.; ZOUMAROU-WALLIS, N.; PATE-BATA, T.; DOSSOU, L.; GOTZ, M.; WINTER, S. Occurrence and characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*, causing bacterial pustules on soybean in Guinea Savanna of Benin. **African Crop Science Journal**, Savana, v.23, p.203-210, 2015.

CAPÍTULO 3

RESISTÊNCIA DE GENÓTIPOS DE SOJA A *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* EM
CÂMARA DE CRESCIMENTO

RESUMO

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Resistência de genótipos de soja a *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea* em câmara de crescimento**. 2021. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.¹

Entre as principais doenças da cultura da soja, destacam-se algumas de etiologia bacteriana, como o crestamento bacteriano, causada por *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea*, sendo um entrave para o sucesso produtivo da cultura. Esta doença vem apresentando grande importância, sendo detectada em soja em diversos países, podendo se tornar um problema a longo prazo. A busca por cultivares resistentes é de extrema importância no manejo da doença, uma vez que outros métodos de controle são pouco eficientes. O presente estudo teve como objetivo determinar a reação de 40 genótipos de soja à inoculação de *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea*. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG) e no Laboratório de Bacteriologia Vegetal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Foi realizada a seleção dos melhores trifólios os quais foram inoculados com o isolado bacteriano UFU C3, padrão de maior agressividade, e assim armazenados em caixa GERBOX e mantidos em câmara de crescimento a 28°C. O ensaio foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado com 40 genótipos e cinco repetições, totalizando 200 parcelas experimentais. O isolado bacteriano UFU C3 foi identificado por meio de características culturais, bioquímicas, moleculares e de patogenicidade em plantas de soja. A severidade da doença foi avaliada, usando uma escala de notas variando de 0 a 5, em cinco avaliações e calculando a AACPS, sendo submetida à análise de variância a 0,01 de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância por meio do programa estatístico R versão 4.0.0. O isolado bacteriano foi identificado como *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea*. Os resultados indicam que a maioria dos genótipos avaliados apresentam suscetibilidade a doença. Os genótipos UFU G39, UFU G22, UFU G13, UFU G38, UFU G40, o genótipo comercial G7 e os genótipos G1 e G2 usados na alimentação humana, foram os que obtiveram maiores níveis de resistência quanto aos demais avaliados sendo considerados moderadamente resistentes, podendo ser importantes fontes de resistência em programas de melhoramento ao crestamento bacteriano.

Palavras-chave: Crestamento bacteriano. *Glycine max*. Severidade. Suscetibilidade.

¹Comitê Orientador: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

ABSTRACT

MOURA, DAHÍS RAMALHO. **Resistance of soybean genotypes to *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* in growth chamber.** 2021. Thesis (Doctorate in Agronomy/Phytotechnics) - Federal University of Uberlândia, Uberlândia¹

Among the main diseases of soybean culture, some of bacterial etiology stand out, such as bacterial crestring, caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, being an obstacle to the productive success of culture. This disease has been of great importance, being detected in soybeans in several countries, and may become a long-term problem. The search for resistant cultivars is extremely important in the management of the disease, since other control methods are inefficient. The present study aimed to determine the reaction of 40 soybean cultivars to the inoculation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. The experiment was conducted in a greenhouse of the Institute of Agricultural Sciences (ICIAG) and in the Laboratory of Plant Bacteriology of the Federal University of Uberlândia (UFU). The best trifólios were obtained, which were inoculated with the bacterial isolate UFU C3, a pattern of greater aggressiveness, and thus stored in a GERBOX box and kept in a growth chamber at 28°C. The assay was carried out in a completely randomized design with 40 genotypes and five replications, totaling 200 experimental plots. The bacterial isolate UFU C3 was identified by cultural, biochemical, molecular and pathogenicity characteristics in soybean plants. The severity of the disease was calculated in five evaluations, using a scale of scores ranging from 0 to 5, the AACPS was submitted to variance analysis to 0.01 of significance and the means were compared by the Scott-Knott test to 5 % significance through the statistical program R version 4.0.0. The bacterial isolate was identified as *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*. The results indicate that most of the genotypes evaluated have levels of susceptibility to the disease. The genotypes UFU G39, UFU G22, UFU G13, UFU G38, UFU G40, commercial genotype G7 and genotypes G1 and G2 focused on human feeding, were the ones that obtained higher levels of resistance being considered moderately resistant, and may be important sources of resistance to bacterial crestring.

Keywords: Endurance. Susceptibility. Severity. *Glycine max*.

¹Steering Committee: Fernando Cezar Juliatti - UFU (Orientador) e Nilvanira Donizete Tebaldi - UFU.

1 INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* L.) é uma das fontes de proteína mais importante do mundo sua utilização, tanto para alimentação humana como animal é bastante apreciada devido ao seu alto teor nutricional. A ampla disponibilidade de variedades de soja, fazem sua produção possível em todas as partes do mundo (KRAWCZYK; BORODYNKO-FILAS, 2020).

Em condições de campo, a cultura pode ser afetada por diversas doenças potencialmente importantes, onde doenças bacterianas ganham uma atenção por serem altamente destrutíveis. O crestamento bacteriano, causado por *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* (Psg), é uma doença limitante para a produção da soja, onde as perdas na cultura podem alcançar 40%, devido à alta capacidade de destruição do tecido foliar em condições favoráveis ao seu desenvolvimento (HARTMAN, 1999).

Considerada a bactéria fitopatogênica mais relevante em todo o mundo, devido a sua alta complexidade, na qual diversos genótipos de soja expressam diferentes graus de resistência para determinados isolados de (Psg), indicando a existência de várias raças fisiológicas (CROSS et. al., 1966).

Característica que torna esse patógeno de difícil controle e com opções limitantes, visto que não se tem um controle eficiente quando se tem uma raça agressiva e uma cultivar suscetível. O que resulta em perdas econômicas expressivas, devido ao insucesso das práticas de manejo, acometendo a produção de soja em todo mundo.

A principal estratégia de manejo para essa fitobactéria, é a utilização de cultivares resistentes, porém no Brasil, por haver pelo menos oito raças descritas, é extremamente laborioso prever como uma determinada cultivar resistente irá se comportar em uma determinada área (LANNA FILHO, 2015).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi a avaliar a reação de genótipos de soja a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* e a seleção de genótipos com resistência a essa bacteriose.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia Vegetal e em Casa de Vegetação, do Instituto de Ciências Agrárias (ICIAG), e da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Uberlândia – MG, com coordenadas geográficas 18° 53' 4.967" S e 48° 15' 36.788" O, durante os meses de abril e julho de 2019.

As plantas utilizadas foram cultivadas em bandejas de 72 células com profundidade de 75mm, contendo substrato solo, areia e húmus na proporção de (4:1:1), em ambiente de casa de vegetação, em temperaturas entre 23 °C a 25 °C, sempre observando as condições de umidade do solo.

O material genético semeado foi constituído de genótipos promissores (Tabela 1), pertencentes ao Programa de Melhoramento Genético, do Laboratório de Germoplasma da UFU (LAGER/UFU) – *Campus* Umuarama e genótipos comerciais e genótipos utilizados na alimentação humana, concedidos pela empresa Nutrially Indústria e Comércio[®], situada em Uberlândia, MG.

As plantas, quando apresentaram de três a quatro trifólios (aproximadamente 15 dias após a semeadura), foram mantidas em câmara úmida por 24 h para a abertura dos estômatos. Após isso, foi realizada a seleção dos melhores trifólios, que foram destacados e lavados em água corrente para a realização da inoculação em laboratório.

O isolado bacteriano UFU C3 (*Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea*), de maior agressividade perante aos demais isolados analisados da UFU (Capítulo 1), foi selecionado para a realização deste experimento, o qual foi recuperado e multiplicado em meio de cultura King B (KING et al., 1954) por 24-48 horas a 28 °C. A suspensão bacteriana foi preparada em água filtrada autoclavada, ajustada em espectrofotômetro para OD₅₄₀=0,2 correspondendo aproximadamente a 1x10⁸ UFC mL⁻¹ (ANDRADE et al., 2013).

Os trifólios foram colocados em bandejas com papel toalha, para evitar o encharcamento das folhas e foram submetidos a inoculação da suspensão bacteriana via pulverização com a adição de uma gota de (Tween).

Tabela 1. Genótipos de soja avaliados quanto a reação à *Pseudomonas savastoni* pv. *glycinea*

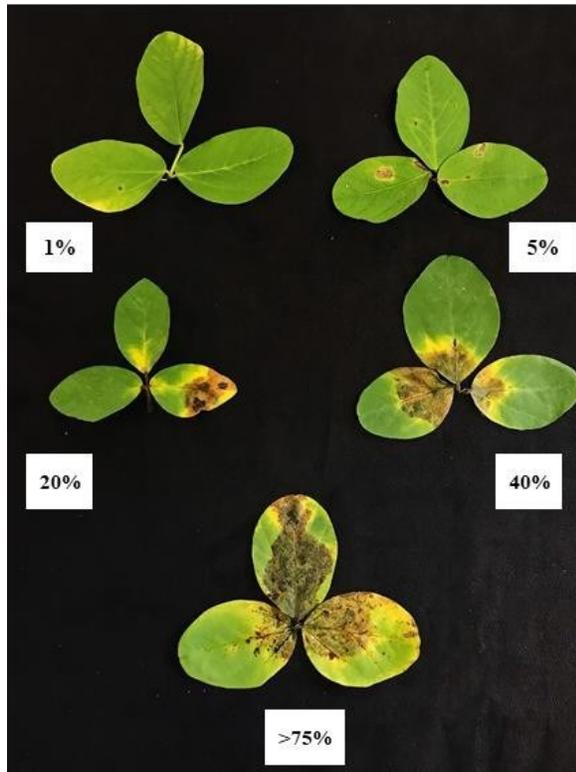
Sigla	Genótipo	Origem
G1	UFU TN 105 AP	Nutrialy
G2	STWART	Nutrialy
G3	EMBRAPA 48	Nutrialy
G4	BRS MG 790 A	Nutrialy
G5	BRS 257	Nutrialy
G6	BR 860 75G1 RR	Comercial
G7	NIDERA 7255	Comercial
G8	TMG 7063	Comercial
G9	BRS LUZIANA RR	Comercial
G10	BRY 08 101 86	Comercial
G11	UFU L 02	LAGER/UFU
G12	UFU L 98	LAGER/UFU
G13	UFU L 526	LAGER/UFU
G14	UFU L 196	LAGER/UFU
G15	UFU L 586	LAGER/UFU
G16	UFU L 528	LAGER/UFU
G17	UFU L 90	LAGER/UFU
G18	UFU L 112	LAGER/UFU
G19	UFU L 10	LAGER/UFU
G20	UFU L 72	LAGER/UFU
G21	UFU L 263	LAGER/UFU
G22	UFU L 176	LAGER/UFU
G23	UFU L 159	LAGER/UFU
G24	UFU L 590	LAGER/UFU
G25	UFU L 71	LAGER/UFU
G26	UFU L 246	LAGER/UFU
G27	UFU L 525	LAGER/UFU
G28	UFU L 14	LAGER/UFU
G29	UFU L 258	LAGER/UFU
G30	UFU L 70	LAGER/UFU
G31	UFU L 69	LAGER/UFU
G32	UFU L 07	LAGER/UFU
G33	UFU L 538	LAGER/UFU
G34	UFU L 173	LAGER/UFU
G35	UFU L 214	LAGER/UFU
G36	UFU L 469	LAGER/UFU
G37	UFU L 298	LAGER/UFU
G38	UFU L 88	LAGER/UFU
G39	UFU L 105	LAGER/UFU
G40	UFU L 200	LAGER/UFU

Foi adicionado uma testemunha pulverizada com água destilada, considerada apenas de caráter de controle da eficiência da inoculação, não sendo utilizada na análise estatística.

Os trifólios inoculados foram distribuídos em caixas plásticas do tipo GERBOX® com papel filtro umedecido com água destilada e com uma estrutura suspensa para não se ter o contato dos trifólios com o papel e armazenados em câmara de crescimento-BOD a 20°C. No interior da BOD foi adicionado um béquer de 1 L contendo água para manter às condições de umidade ideal para o desenvolvimento da bactéria. O ensaio foi realizado em um delineamento inteiramente casualizado, com quarenta genótipos e com cinco repetições.

A severidade do cretamento bacteriano foi avaliada aos três, seis, nove e doze dias após a inoculação, usando uma escala diagramática modificada descrita por Basu e Butler (1986), com notas variando de 0 a 5, onde: 0 = folha sem sintoma, 1 = de 1% a 4,9% da folha lesionada, 2 = de 5 a 19,9% da folha lesionada, 3 = de 20 a 39,9 da folha lesionada, 4 = 40 a 74,9 % da folha lesionada e 5= acima de 75% da folha lesionada (Figura 1).

Figura 1- Representação da escala diagramática em notas para cretamento bacteriano em trifólios de soja, composta por cinco valores de severidade da doença (1= 1%; 2= 5%; 3= 20%; 4= 40%; e 5= >75% e ou morte do tecido). Fonte: Autora.



Com as notas de severidade, foi calculado a Área Abaixo da Curva de Progresso da Severidade (AACPS) pela fórmula:

$$AACPS = \sum ((Y_i + Y_{i+1}) / 2) (t_{i+1} - t_i) \text{ onde:}$$

Y representa a intensidade da doença

t o tempo

i o número de avaliações no tempo (CAMPBELL; MADDEN, 1990).

Os genótipos foram classificados como: resistentes (R), quando receberam nota 1; altamente resistentes (AR), com nota 2; moderadamente resistentes (MR), com nota 3; pouco resistentes (PR), com nota 4 e suscetíveis (S) para nota 5.

Estimou-se a AACPS em até 9,0 para considera-los como altamente resistentes (AR), entre 9,1 e 18,0 para considera-los como moderadamente resistentes (R), entre 18,1 e 27,0 para considera-los como moderadamente resistente (MR), maior que 27,1 para considera-los como suscetíveis (S).

Foi ajustado a técnica dos Mínimos Quadrados Generalizados (Generalized Least Squares, GLS) após o atendimento da pressuposição de normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 0,05 de significância.

Para o modelo, foi criado um parâmetro de variação para cada genótipo para modelar a alta variância dos dados. O ajuste foi realizado pelo método Restricted Maximum Likelihood (REML) e ajustado para 5000 iterações para o algoritmo de otimização e com o método de otimização SANN (Belisle, 1992). A AACPS foi submetida à análise de variância a 0,01 de significância e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5 % de significância por meio do programa estatístico R versão 4.0.0.

2.1 Teste de patogenicidade no hospedeiro e reação de hipersensibilidade

Plantas de soja, cultivar BRS 257 790 A, foram semeadas em vasos plásticos de 500 g contendo substrato solo, areia e húmus na proporção de (4:1:1), com 2 plantas por vaso. Aproximadamente 15 dias após a semeadura, quando as plantas apresentavam de 3 a 4

trifólios, com auxílio de uma seringa, realizou-se inoculação da suspensão bacteriana e para a reação de hipersensibilidade pela inoculação da suspensão bacteriana em folhas de fumo. As plantas foram mantidas em câmara úmida 24 horas antes e após a inoculação.

A partir do aparecimento dos sintomas (lesões encharcadas com coloração marrom escura circundada por halo verde amarelo) foi realizado reisolamento da bactéria. Onde Fragmentos foliares foram descontaminados com álcool 50% por 1 minuto, hipoclorito de sódio 2% por 3 minutos e posterior lavagem em água destilada esterilizada, os quais foram colocados em placa de Petri contendo o meio de cultura King B e incubados em estufa a 28°C por 48 horas. Os isolados foram preservados e mantidos na coleção de trabalho do Laboratório de Bacteriologia do ICIAG/UFU.

2.2 Caracterização cultural, bioquímica e fisiológica

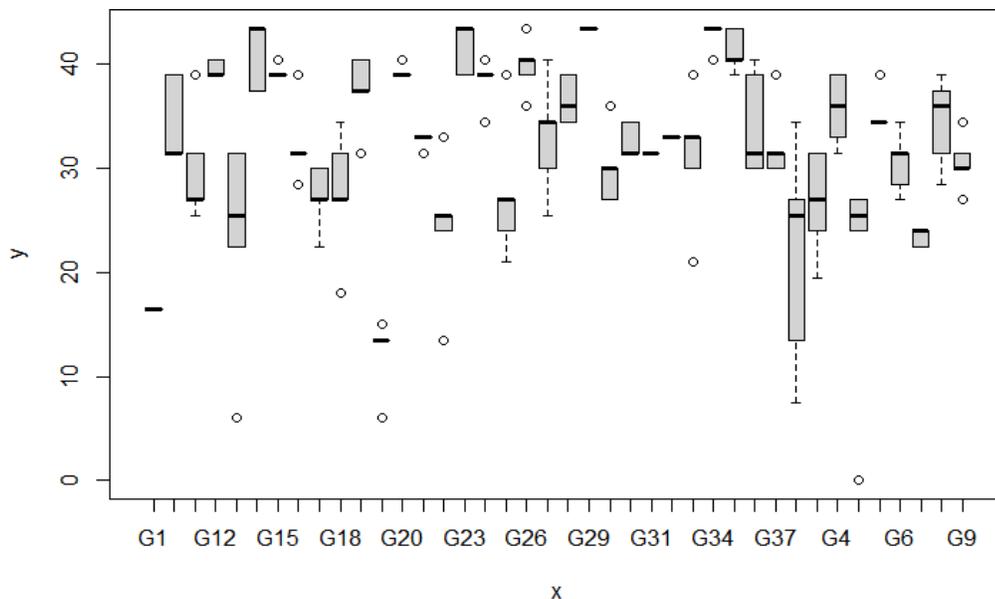
As colônias suspeitas foram repicadas e cultivadas para o meio King B e caracterizadas bioquímica e fisiologicamente pelos testes de: Gram, Oxidação/Fermentação, YDC, motilidade, produção de ácidos a partir da glicose de inositol, sorbitol, sacarose e D-arabinose, pela produção das enzimas arginina dihidrolase, liquefação da gelatina, oxidase, catalase e crescimento a 37°C, incluindo os testes LOPAT (SCHAAD, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a classificação dos genótipos, estimou-se a AACPS em até 9,0 para considerá-los como altamente resistentes (AR), entre 9,1 e 18,0 para considerá-los como moderadamente resistentes (R), entre 18,1 e 27,0 para considerá-los como moderadamente resistente (MR), maior que 27,1 para considerá-los como suscetíveis (S).

Pela alta heterogeneidade de variâncias presente nos dados, justificado pelas altas diferenças entre os genótipos, onde genótipos resistentes tendem a possuir menor variabilidade entre as repetições e genótipos suscetíveis maiores (Figura 2), foi ajustado a técnica dos Mínimos Quadrados Generalizados (Generalized Least Squares, GLS) após o atendimento da pressuposição de normalidade dos resíduos pelo teste de Kolmogorov-Smirnov a 0,05 de significância.

Figura 2 - Teste de box plot para a área abaixo da curva de progresso da severidade do crestamento bacteriano, dos 40 genótipos.



A análise de variância obtida pelo método dos Mínimos Quadrados Generalizados detectou diferenças significativas para os genótipos avaliados (p -valor $<0,001$). Pela técnica de agrupamento de Scott-Knott, observou-se a diferença entre os genótipos que foram classificados em 31 grupos distintos (Tabela 2).

Tabela 2. Área abaixo da curva do progresso da severidade (AACPS) de isolados de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* em diferentes genótipos em BOD.

Genótipo	Média da AACPS	Classificação
UFU L 258 (G29)	43,5±1,4 a	S
UFU L 173 (G34)	42,9±0,0 b	S
UFU L 159 (G23)	41,7±4,3 c	S
UFU L 214 (G35)	41,4±6,0 d	S
UFU L 196 (G14)	41,1±0,5 e	S
UFU L 246 (G26)	39,9±7,4 f	S
UFU L 98 (G12)	39,6±2,7 g	S
UFU L 586 (G15)	39,3±2,9 h	S
UFU L 72 (G20)	39,3±0,8 h	S
UFU L 590 (G24)	38,4±3,2 i	S
UFU L 10 (G19)	37,5±3,0 j	S
UFU L 14 (G28)	36,6±2,0 k	S
BRS MG 790 A (G4)	35,7±3,0 l	S
BRS 257 (G5)	35,4±1,0 m	S
BRY 08 101 86 (G10)	34,5±1,8 n	S
TMG 7063 (G8)	34,5±3,1 n	S
UFU L 469 (G36)	34,2±0,0 o	S
UFU L 525 (G27)	33,0±1,5 p	S
UFU L 07 (G32)	33,0±1,4 p	S
UFU L 263 (G21)	32,7±0,3 q	S
UFU L 70 (G30)	32,7±0,7 q	S
UFU L 528 (G16)	32,4±3,2 r	S
UFU L 298 (G37)	32,4±0,0 r	S
UFU L 69 (G31)	31,5±2,0 s	S
UFU L 538 (G33)	31,2±1,6 t	S
BR 860 75G1 RR (G6)	30,6±1,5 u	S
BRS LUZIANA RR (G9)	30,6±0,7 u	S
UFU L 02 (G11)	30,0±1,4 v	S
EMBRAPA 48 (G3)	30,0±1,8 v	S
UFU L 112 (G18)	27,6±1,9 w	S
UFU L 71 (G25)	27,6±1,0 w	S
UFU L 90 (G17)	27,3±0,3 x	S
UFU L 105 (G39)	26,7±0,5 y	MR
UFU L 176 (G22)	24,3±0,4 z	MR
UFU L 526 (G13)	23,4±0,9 a1	MR
NIDERA 7255 (G7)	23,4±1,4 a1	MR
UFU L 88 (G38)	21,6±0,6 b1	MR
UFU L 200 (G40)	21,5±1,2 c1	MR
UFU TN 105 AP (G1)	16,5±0,5 d1	MR
STWART (G2)	12,3±0,0 e1	MR

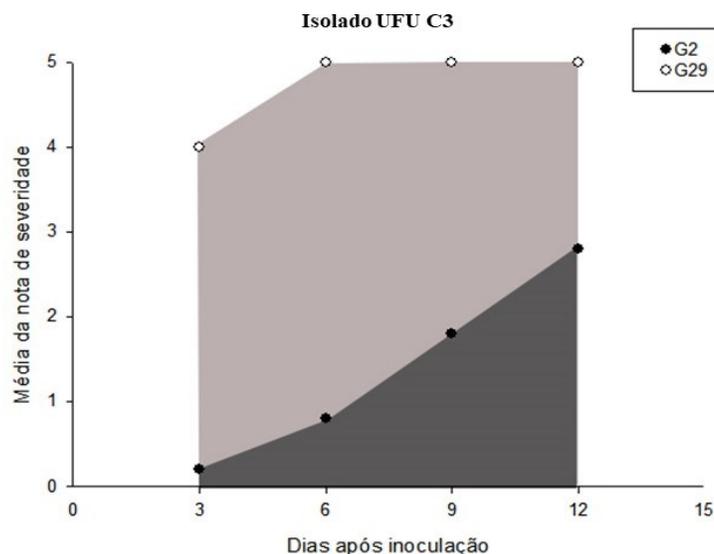
Médias ± Erro padrão seguidas por letras iguais minúsculas na coluna não diferem entre si pelo método de agrupamento de Scott-Knott. Classificação baseada pela estimação da AACPS, sendo: AACPS ≤ 9 – Altamente Resistentes (AR); 9.1 ≤ AACPS ≤ 18 - Resistentes (R); 18.1 ≤ AACPS ≤ 27; Moderadamente Resistentes (MR) e AACPS > 27,1 - Suscetíveis (S).

Os resultados do presente estudo foram agrupados em 31 grupos, sendo que dos 40 genótipos avaliados, foram classificados como suscetível e moderadamente resistente, não observando nenhum genótipo avaliado como resistente e/ou altamente resistente ao cretamento bacteriano, fato este devido uma seleção de um isolado com alto poder de agressividade. Dos quais 32 genótipos arranjaram-se em suscetível (80%) e 8 genótipos moderadamente resistentes (20%).

De acordo com as classificações dos níveis de resistência, dos 32 genótipos considerados suscetíveis (S), 25 genótipos são pertencentes ao programa de melhoramento da LAGER/UFU, 4 são genótipos comerciais, 3 genótipos Nutrially utilizados para alimentação humana. Para os 8 genótipos considerados (MR), 5 são do banco de melhoramento LAGER/UFU, 1 comercial e 2 utilizados para alimentação humana.

Para a área abaixo da curva de progresso da severidade (AACPS) do cretamento bacteriano (Figura 3), verificou-se que ao longo do tempo das avaliações o progresso da doença aumentou, onde o genótipo (G29) foi o que apresentou maior proporção de doença (43,5%) no decorrer das avaliações, portanto, maior suscetibilidade. O genótipo (G2) apresentou a menor proporção (12,3%), sendo este o que apresentou o menor índice de severidade da doença, considerado moderadamente resistente, indicando um genótipo promissor para o uso em programas de melhoramento.

Figura 3- Curva de progresso do cretamento bacteriano da soja, para os genótipos G2 (STWART) e G29 (UFU L 258). Eixo Y = Severidade (nota); X= Dias após a inoculação.



A avaliação da resistência de genótipos e o conhecimento de suas reações é de suma importância para a contribuição em programas de melhoramento, afim de proporcionar a escolha de fontes contínuas de resistência a doenças, visando o desenvolvimento de genótipos superiores e garantindo o alto rendimento na cultura.

A bactéria *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* possui grande número de raças, sendo já relatadas 12 raças fisiológicas, onde no Brasil em campos produtivos 8 foram encontradas (LANNA-FILHO, 2015).

Contudo, a raça 4 ainda é a raça mais agressiva e predominante na cultura da soja no mundo (VIDIĆ et al., 2013). Grande diversidade é encontrada nessa bacteriose fato este que faz com que um número grande de cultivares apresentem os sintomas da doença, assegurando os resultados presente nesta pesquisa.

Essa diversidade de raças evidencia que muitos genes de avirulência (avr) estão presentes o que indica que muitas raças de *P. savastanoi* pv. *glycinea* são capazes de causar doença na soja na ausência do gene de resistência correspondente. Os genes de avirulência já identificados em diversas raças de *P. savastanoi* pv. *glycinea*, como: avrA, avrB (gene de resistência: Rpg1), avrC (gene de resistência: Rpg3), avrE (gene de resistência: Rpg5), avrF (gene de resistência: Rpg6) e avrG (gene de resistência: Rpg7) já foram reportados na literatura (FARHATULLAH et al., 2016; STASKAWICZ et al., 1984; STASKAWICZ et al., 1987).

Para a raça 4 de *P. savastanoi* pv. *glycinea*, nenhuma fonte de resistência tem sido relatada em genótipos de soja, indicando que o possível gene avrD nessa raça tenha sofrido mutação não desencadeando resposta imune por parte do hospedeiro (KEITH et al., 1997). Essa condição justifica a natureza dominante da raça 4 nos campos de produção, e também expõe a dificuldade em encontrar fontes de resistência entre os genótipos de soja.

De acordo com Moura et al. (2015) em estudos realizado com *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, em condições favoráveis, essa bacteriose pode causar grandes perdas, visto que não existe variedades e produtos recomendados que apresentem boa eficiência, devido ser uma fitobactéria que tem se mostrado uma elevada agressividade e dispersão muito rápida.

A existência de raças distintas de *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* é sugestivo

de uma interação gene a gene em uma interação gene por gene, no qual a expressão de resistência a doenças é especificamente determinadas pelos genótipos do hospedeiro e do patógeno e geralmente é controlado por um único locus dominante nos dois parceiros em interação (MINGSHENG et. al., 2011).

O locus dominante na planta é geralmente referido como um gene de resistência, e o dominante locus no patógeno é denominado gene de avirulência. Em termos simples, demonstra-se que o gene da avirulência condiciona ou controla a capacidade de uma raça específica de um patógeno induzir uma resposta de defesa (HR) apenas em uma planta específica ou cultivar que contém um específico e, portanto, correspondente, gene de resistência.

Por outro lado, se uma determinada corrida de um patógeno não contém um gene específico de avirulência ou se o hospedeiro tem um alelo recessivo na resistência correspondente locus, a resistência à doença não ocorre e a doença resulta. Assim, as várias combinações de genes de avirulência no genes patógenos e de resistência na planta resultam em um padrão da especificidade de raça-cultivar que é observada em *Psg* (STASKAWICZ et al.,1984).

Long et al. (1985), verificou que somente quando as condições como temperatura e umidade relativa foram padronizados uma reação suscetível típica para a doença foi obtido. Cross et al. (1966) relataram que alguns patógenos tendem a ter resistência a altas temperaturas (27 °C), mas com suscetibilidade a baixas temperaturas (15 °C a 21 °C), problematizando ainda mais as avaliações dos resultados. Sendo então, a avaliação de resistência de genótipos de soja em ambiente controlado com o do presente estudo, uma alternativa confiável e favorável para avaliação desse patógeno, visto que todos os genótipos apresentaram sintomas típicos do cretamento bacteriano, no qual pode ser ajustado a temperatura e umidade ideal para o seu desenvolvimento.

Os isolados bacterianos detectados nos trifólios, foram caracterizados cultural, bioquímica e fisiologicamente como: Gram negativo, oxidativo, King B fluorescente mostrando uma cor esbranquiçada com transparência, lisas e margens circulares, pertencem ao grupo LOPAT Ia, reação de hipersensibilidade em fumo e patogenicidade no hospedeiro positivos, caracterizando os isolados como *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*.

Como bactericidas eficazes não estão disponíveis na agricultura, plantio de

cultivares de baixa suscetibilidade e melhoramento genético para a obtenção de cultivares resistentes é uma possibilidade para o controle de doenças, onde essa estratégia só pode ser bem-sucedida quando as determinações das raças são conhecidas (SINCLAIR, 1982).

Os resultados do presente trabalho mostraram a importância de se conhecer a reação dos genótipos do Programa de Melhoramento Genético da UFU, visto que ainda não se conhecia o comportamento de muitos dos genótipos utilizados como fontes de resistência ao cretamento bacteriano. Dessa forma, o melhorista pode escolher o melhor genótipo entre a resistência a *Psg*, onde conhecer os genótipos suscetíveis é importante, visto que, esses materiais podem ser evitados nos programas de melhoramento.

Métodos mais rápidos e eficientes na identificação dessas doenças são necessários, uma vez que a detecção e a correta identificação do agente causal de uma doença são fatores essenciais para se evitar a sua introdução em novas áreas de cultivo, bem como na adoção de práticas eficientes de controle. Portanto, esforços para introduzir cultivares resistentes a *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* devem basear principalmente na correta identificação e reação da resistência a esse do patógeno.

4 CONCLUSÕES

Os resultados indicam que a maioria dos genótipos avaliados apresentam níveis diferentes de resistência à *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea*, onde trinta e dois genótipos foram agrupados como suscetíveis.

Os genótipos do programa de melhoramento LAGER/UFU, UFU 13, UFU 22, UFU 38, UFU 39 e UFU40; Genótipo comercial G7 (NIDERA 7255); e genótipos com finalidade para alimentação humana G1 (UFU TN 105 AP) e G2 (STWART), obtiveram maiores níveis de resistência sendo considerados moderadamente resistentes, podendo ser importantes fontes de resistência ao cretamento bacteriano.

REFERÊNCIAS

- BASU, P.K.; BUTLER, G. An evaluation of soybean bacterial blight assessment methods. **Canadian Journal of Plant Pathology**, Toronto, v.8, p.459-463, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1080/07060668609501788>
- BELISLE, C. J. P. Convergence theorems for a class of simulated annealing algorithms on Rd. **Journal of Applied Probability**, [s.l.], v. 29, p. 885–895, 1992. DOI: [10.2307/3214721](https://doi.org/10.2307/3214721).
- CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley, 1990. 532 p.
- CROSS, .1. E., B. W. KENNEDY, J. W. LAMBERT, R. L. COOPER. Pathogenic races of the bacterial blight pathogen of soybeans, *Pseudomonas glycinea*. **Plant Dis.** [s.l.] v.50, p.557-560, 1966.
- FARHATULLAH; STAYTON, M.; GROOSE, R.; KHAN, M. J. Genetic analysis of race-specificity of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Pakistan Journal of Botany**, [s.l.] v. 43, n.7 p.13. 2016.
- GORADIA, L.; HARTMAN, G.L.; DANIEL, S.L. Evaluation of glyphosate-tolerant soybean cultivars for resistance to bacterial pustule. **European Journal of plant Pathology**, [s.l.], v.124, p. 331-335, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-008-9410-2>
- HARTMAN, G.L. Compendium of soybean diseases. **The American Phytopathological Society**: APS Press, St. Paul, Minnesota, 1999.
- KEITH, L. W. BOYD, C.; KEEN, N. T.; PARTRIDGE, J. E. Comparison of avrD alleles from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s.l.], v. 10, p. 416-422, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.3.416>
- KING, E. O., M. K. WARD, D. E. RANEY. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **J. Lab. Clin. Med.** [s.l.], v. 44, p. 301-307. (1954).
- KRAWCZYK, K., BORODYNKO-FILAS, N. *Kasokonia cownii* as the New Bacterial Pathogen Affecting Soybean (*Glycine max* Willd.). **Eur J Plant Pathol**, [s.l.], v.157, p.173–183, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01998-8>
- LANNA-FILHO, R. Fitobactérias na cultura da soja. In: Lemes, E. M.; Castro, L.H. S.; Assis, R. T. (org.). **Doenças da soja**: melhoramento genético e técnica de manejo. Campinas: Millennium, 2015. p. 83-92.
- LONG, M., P. BARTON-WILLIS, B. J. STASKAWICZ, D. DAHLBECK, N. T. KEEN. Further studies on the relationship between glyceollin accumulation and the resistance of

soybean leaves to *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Phytopathology**, [s.l.], v.75, p. 235-239. 1985. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-235>

MINGSHENG QI, DONGPING WANG, CARL A. BRADLEY, YOUFU ZHAO. Genome Sequence Analyses of *Pseudomonas savastanoi* pv. *glycinea* and Subtractive Hybridization-Based Comparative Genomics with Nine *Pseudomonads*. **PLoS ONE**, [s.l.], v.6, n.1, p. 16451, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016451>

MOURA. L., GARCIA, E., OLGA, A., ARES, A., ABELLEIRA, A., MANSILLA, P. Identification and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (*Psa*) in Entre Douro and Minho region (Portugal). **Revista de Ciências Agrárias**, [s.l.], 38(2): 196-205. 2015. DOI: <https://doi.org/10.19084/rca.16915>

SCHAAD, N. W. Detection and identification of bacteria. In: SAETTLER, A.W., SCHAAD, N.W., ROTH, D.A. (ed). Detetion of bacteria in seed and other planting material. Minneapolis: **APS Press.**, 2001. 122p.

SINCLAIR, J. B. Compendium of Soybean Diseases, Second Edition. **American Phytopathol. Soc**, St Paul, Minn., USA, p. 104, 1982.

STASKAWICZ, B. J.; DAHLBECK, D.; KEEN, N. T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L.) Merr. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s.l.], v.81, p. 6024-6028, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.81.19.6024>

STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N.; NAPOLI, C. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. **Journal of Bacteriology**, [s.l.], v.169, n. 12, p.5789-5794, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.169.12.5789-5794.1987>

VIDIĆ, M.; DORDEVIĆ, V.; PETROVIĆ, K.; MILADINOVIĆ, J. Review of soybean resistance to pathogens. **Ratarstvo ipovrtarstvo**, Novi Sad, Serbia, v. 50, p. 52-61, 2013. DOI: [10.5937/ratpov50-4038](https://doi.org/10.5937/ratpov50-4038)