

**INSTITUTO AGRONÔMICO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL**

**Avaliação da N-acetilcisteína no controle da murcha bacteriana do feijoeiro causada por**  
*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

**VINICIUS VENTURINI FERREIRA**

**Orientadora: Dra. Alessandra Alves de Souza**

**Co-orientador: Dr. Alisson Fernando Chiorato**

Dissertação apresentada ao Instituto Agronômico de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura tropical e subtropical, Área de Concentração em Genética, Biotecnologia e Melhoramento de Plantas.

Campinas-SP  
2026

Ficha elaborada pela bibliotecária do Seção de Documentação Científica  
do Instituto Agronômico

F383a Ferreira, Vinicius Venturini  
Avaliação da N-acetilcisteína no controle da murcha bacteriana do  
feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.  
*Flaccumfaciens* / Vinicius Venturini Ferreira, Campinas, 2026. 96 fls

Orientadora: . Alessandra Alves de Souza  
Co-orientador: . Alisson Fernando Chiorato  
Dissertação (Mestrado) Agricultura Tropical e Subtropical – Instituto  
Agronômico

1. Feijoeiro - Doenças. 2. *Phaseolus vulgaris* 3. Murcha  
bacteriana. 4. Biofilme. 5 Estresse oxidativo. 6. Manejo sustentável.  
I. de Souza, Alessandra Alves.. II. Chiorato, Alisson Fernando  
III. Título

CDD.632.32

## ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aos 23 de março de 2026, às 14h00, reuniu-se a banca examinadora homologada pelo Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical, composta pelos membros abaixo listados visando à defesa de dissertação de mestrado de Vinicius Venturini Ferreira, para obtenção do título de "MESTRE", conforme Processo SAA nº PRT6957/2024-58. A sessão presidida pela Profª. Drª. Alessandra Alves de Souza, orientadora do aluno, foi realizada em sessão pública aberta. Iniciados os trabalhos, o candidato submeteu-se ao exame de sua dissertação, intitulada "Avaliação da N-acetilcisteína no controle da murcha bacteriana do feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*". Terminado o exame, procedeu-se ao julgamento, cujo resultado foi o seguinte:

Profª. Drª. Alessandra Alves de Souza - APTA

APROVADO  REPROVADO ( )

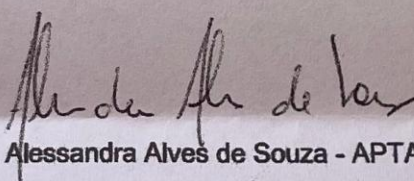
Prof. Dr. Sérgio Augusto Morais Carbonell - IAC

APROVADO  REPROVADO ( )

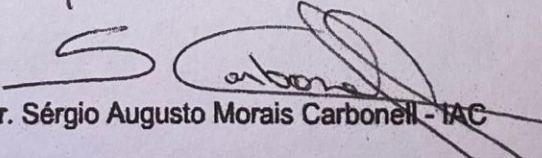
Prof. Dr. Fernando César Bachiega Zambrosi - IAC

APROVADO  REPROVADO ( )

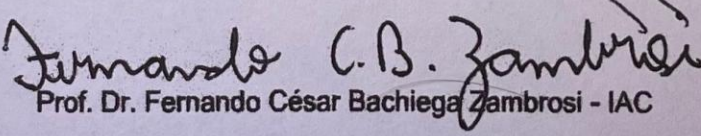
Apurados os resultados, constatou-se que o candidato foi habilitado, fazendo jus, portanto, ao título de "MESTRE EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL", na área de concentração: Biotecnologia, Genética e Melhoramento de Plantas, do que, para constar, lavrou-se a presente ata, assinada pelos membros da comissão examinadora:



Profª. Drª. Alessandra Alves de Souza - APTA



Prof. Dr. Sérgio Augusto Morais Carbonell - IAC



Prof. Dr. Fernando César Bachiega Zambrosi - IAC

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Cristiane e Antônio, por todo o apoio emocional nos momentos difíceis.

À minha família e aos meus amigos, por serem abrigo, força e presença em todos os momentos.

Aos professores e mentores que contribuíram para a minha formação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, em especial aos meus pais, Cristiane e Antônio, por todo o amor, carinho, apoio, esforço e dedicação aplicados à minha educação. Agradeço também aos meus irmãos, Fernando e Thiago, que sempre me incentivaram a evoluir cada vez mais.

À minha orientadora, Dra. Alessandra Alves de Souza, que acreditou em mim e me motivou desde o início do meu mestrado. Agradeço pelos ensinamentos, oportunidades e confiança.

Ao meu co-orientador Dr. Alisson Fernando Chiorato, por ter me dado todo o suporte necessário para a condução do projeto.

Ao melhor grupo de amigos que eu poderia ter: Felipe, Arthur e Victor, que me apoiaram e passaram comigo por momentos difíceis.

Aos amigos que o IAC me deu — Isabelle, Bruna, Victória, Daniella, Mariana, Dhiôvanna, Paulo, Lucas, Matheus, Maria e Máira — que mudaram minha perspectiva sobre o mestrado. Sem vocês, não teria sido a mesma coisa. Agradeço também aos amigos que fiz em Campinas, que me auxiliaram desde o início.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e, em especial, ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira (CCSM) e ao Programa de Melhoramento Genético do Feijoeiro (PMGF-IAC), por abrirem as portas dos laboratórios para a realização dos experimentos deste projeto. Agradeço também aos pesquisadores, alunos e funcionários desta instituição pelas valiosas contribuições ao estudo.

Aos funcionários da pós-graduação, por todo o auxílio durante a realização deste trabalho.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de mestrado e apoio ao desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço também à Amazon AgroSciences e à CiaCamp pelo financiamento do projeto, por meio da Fundação de Apoio à Pesquisa Agrícola (FUNDAG), bem como pelo apoio na execução desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>8</b>
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>Capítulo 1- N-Acetylcysteine Inhibits Growth and Biofilm Development of the Gram-Positive Plant Pathogen <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>24</b>
<b>2. MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>27</b>
<b>3. RESULTS .....</b>	<b>30</b>
<b>4. DISCUSSION.....</b>	<b>37</b>
<b>5. REFERENCES .....</b>	<b>41</b>
<b>Capítulo 2 - Avaliação do N-acetilcisteína no manejo da murcha bacteriana do feijoeiro causada por <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>45</b>
<b>3. MATERIAL E METODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1    Ensaio de patogenicidade e definição da concentração de inóculo .....	45
3.2    Avaliação de métodos de inoculação de <i>Cff</i> em plantas de feijoeiro.....	46
3.3    Avaliação das diferentes formas de aplicação do NAC nos sintomas da murcha bacteriana em condições de casa-de-vegetação.....	49
3.4    Avaliação das diferentes formas de aplicação do NAC nos parâmetros de produtividade.....	51
3.5    Avaliação do NAC no controle da murcha bacteriana em condições de campo.....	52
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1    Severidade dos sintomas associados a concentração <i>Cff</i> .....	57
4.2    Eficiência de métodos de inoculação na indução de sintomas de doença	59

4.3	Efeito das diferentes formas de aplicação do NAC na sintomatologia da murcha bacteriana.....	66
4.4	Efeito das formas de aplicação selecionadas, sobre os parâmetros de produtividade.....	68
4.5	Experimento em condições de campo: progresso da doença, produtividade e qualidade de sementes em plantas tratadas com o NAC .....	70
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>877</b>
	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>922</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>93</b>

## RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura de grande relevância alimentar e socioeconômica, cuja produtividade pode ser severamente comprometida pela murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), patógeno vascular associado à colonização do xilema e à formação de biofilme. Considerando as limitações das estratégias convencionais de manejo e o papel do biofilme na patogênese, esta dissertação teve como objetivo avaliar o potencial da N-acetilcisteína (NAC) no controle de *Cff*, integrando estudos *in vitro* e *in plantas* sob condições de casa de vegetação e campo. No Capítulo 1, foram caracterizados o crescimento bacteriano, o efeito antimicrobiano e antibiofilme do NAC sob a *Cff*, utilizando a estirpe IBSBF 2869 previamente confirmada por PCR e sequenciamento de 16S rRNA. Em meio NBY a 28 °C, *Cff* apresentou fase exponencial entre 14 e 51 h e tempo de geração aproximado de 6 h, enquanto o NAC inibiu o crescimento com concentração inibitória mínima (MIC) de 8 mg mL<sup>-1</sup> e concentração bactericida mínima (MBC) de 20 mg mL<sup>-1</sup>. Ensaio de formação de biofilme e microscopia eletrônica de varredura demonstraram organização progressiva do biofilme entre 24 e 72 h e mostraram que o NAC suprimiu a formação de biofilme nas maiores concentrações testadas. No Capítulo 2, foi estabelecido um modelo experimental reprodutível de murcha bacteriana em casa de vegetação, definindo-se a concentração de inóculo e o método de inoculação que resultaram em maior severidade e colonização vascular; a progressão dos sintomas foi quantificada por meio da severidade visual e da área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC), e a presença de agregados bacterianos em vasos do xilema foi confirmada por microscopia eletrônica de varredura. Produtos à base de NAC foram avaliados em diferentes formas de aplicação, em casa de vegetação e em experimento de campo com combinações de tratamento de sementes, aplicações foliares e via solo. Em casa de vegetação, tratamentos contendo NAC reduziram a severidade da murcha, com destaque para a combinação de tratamento de sementes com Cerealis TS associado à aplicação foliar de Cerealis, que apresentou os menores valores de severidade e de AUDPC, além de preservar, número de sementes e peso de grãos em plantas inoculadas com *Cff* em níveis mais próximos ao controle sem patógeno. Em condições de campo, a inoculação com *Cff* resultou em aumento da severidade da doença e em redução de produtividade, enquanto tratamentos com NAC reduziram a pressão do inóculo e apresentaram evidências de redução parcial das perdas produtivas, com diferenças entre as estratégias de aplicação. De forma integrada, os resultados demonstram que o NAC exerce forte efeito inibitório e antibiofilme sobre *Cff* *in vitro*, confirma a formação de biofilme em vasos do feijoeiro durante a infecção e evidencia que aplicação do NAC via foliar pode compor estratégias complementares de manejo da murcha bacteriana, com impacto sobre a progressão dos sintomas e sobre componentes de produtividade, desde que associados a esquemas de aplicação adequados e a práticas preventivas já consolidadas.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris*; murcha bacteriana; biofilme; estresse oxidativo; manejo sustentável.

## ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a crop of great food and socioeconomic relevance, whose productivity can be severely compromised by bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), a vascular pathogen associated with xylem colonization and biofilm formation. Considering the limitations of conventional management strategies and the role of biofilm in pathogenesis, this dissertation aimed to evaluate the potential of N-acetylcysteine (NAC) in the control of *Cff*, integrating in vitro and in planta studies under greenhouse and field conditions. In Chapter 1, bacterial growth, as well as the antimicrobial and antibiofilm effects of NAC on *Cff*, were characterized using strain IBSBF 2869 previously confirmed by PCR and 16S rRNA sequencing. In NBY medium at 28 °C, *Cff* exhibited an exponential phase between 14 and 51 h and an approximate generation time of 6 h, while NAC inhibited bacterial growth with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 8 mg mL<sup>-1</sup> and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 20 mg mL<sup>-1</sup>. Biofilm formation assays and scanning electron microscopy demonstrated progressive biofilm organization between 24 and 72 h and showed that NAC suppressed biofilm formation at the highest concentrations tested. In Chapter 2, a reproducible experimental model of bacterial wilt was established under greenhouse conditions by defining the inoculum concentration and inoculation method that resulted in greater disease severity and vascular colonization; symptom progression was quantified through visual severity ratings and the area under the disease progress curve (AUDPC), and the presence of bacterial aggregates within xylem vessels was confirmed by scanning electron microscopy. NAC-based products were evaluated under different application strategies in greenhouse and field experiments, including seed treatment, foliar applications, and soil application. Under greenhouse conditions, treatments containing NAC reduced wilt severity, with emphasis on the combination of seed treatment with Cerealis TS associated with foliar application of Cerealis, which presented the lowest severity and AUDPC values and preserved seed number and grain weight in plants inoculated with *Cff* at levels closer to the non-inoculated control. Under field conditions, inoculation with *Cff* resulted in increased disease severity and reduced productivity, whereas NAC treatments reduced inoculum pressure and showed evidence of partial mitigation of yield losses, with differences among application strategies. Overall, the results demonstrate that NAC exerts a strong inhibitory and antibiofilm effect on *Cff* in vitro, confirm biofilm formation within common bean xylem vessels during infection, and indicate that foliar application of NAC may compose complementary strategies for bacterial wilt management, influencing symptom progression and yield components when associated with appropriate application schemes and established preventive practices.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*; bacterial wilt; biofilm; oxidative stress; sustainable management.

## INTRODUÇÃO GERAL

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui uma das principais leguminosas cultivadas no mundo, sendo amplamente produzido em diferentes sistemas agrícolas e desempenhando papel relevante na segurança alimentar e na geração de renda, especialmente em países em desenvolvimento (Karavidas et al., 2022). Além de sua ampla distribuição geográfica e diversidade genética, com dois centros principais de domesticação (Andes e Mesoamérica), o feijão constitui importante fonte de proteína vegetal, fibras, minerais e compostos bioativos associados à prevenção de doenças crônicas (Uebersax et al., 2023).

No contexto brasileiro, o feijão apresenta não apenas importância nutricional, mas também relevância cultural e socioeconômica, sendo um dos alimentos mais consumidos pela população e tradicionalmente associado ao arroz como prato típico nacional, além de ser amplamente cultivado em diferentes sistemas de produção (Lovato et al., 2018). A produção nacional supera 2,7 milhões de toneladas anuais, destinando-se majoritariamente ao consumo interno, o que posiciona o país entre os maiores produtores e consumidores mundiais de feijão (A. Ferreira et al., 2025).

Sob o ponto de vista agrônomo, o feijoeiro apresenta ciclo relativamente curto e grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, favorecendo sua inserção em sistemas sustentáveis de produção (Zia et al., 2022), inclusive com benefícios associados à fixação biológica de nitrogênio (Uebersax et al., 2023). Entretanto, apesar de seu potencial produtivo, a cultura é altamente suscetível a estresses bióticos e abióticos, que comprometem significativamente a produtividade (Carbonell et al., 2021).

Entre os estresses bióticos, as doenças bacterianas assumem relevância crescente em sistemas intensivos de produção, particularmente devido à dificuldade de controle e à natureza sistêmica de algumas infecções. A murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) tem sido reconhecida como uma ameaça emergente e reemergente em diversas regiões produtoras (Harding et al., 2022; Osdaghi et al., 2020).

Estudos recentes confirmam a presença de Cff em importantes regiões produtoras do Paraná, demonstrando alta severidade em cultivares suscetíveis e evidenciando sua adaptabilidade a condições de campo (Puia et al., 2021). A transmissão ocorre principalmente via sementes contaminadas, constituindo o principal mecanismo de disseminação a longas distâncias e dificultando estratégias de contenção da doença (Kizheva et al., 2024).

Os sintomas incluem clorose internerval, necrose foliar, murcha sistêmica e escurecimento vascular, decorrentes da colonização do xilema e consequente interferência no fluxo de água (Osdaghi et al., 2020). Além da transmissão por sementes, *Cff* apresenta capacidade de sobreviver em diferentes nichos ecológicos. Estudos demonstram sua sobrevivência na filosfera por até sete dias e na rizosfera por até 21 dias em diversas culturas, incluindo cereais e oleaginosas, que podem atuar como hospedeiros alternativos assintomáticos (Nascimento et al., 2021).

A colonização vascular envolve mecanismos de adesão e formação de biofilmes, que consistem em comunidades organizadas envoltas em matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), e conferem proteção contra estresses ambientais e agentes antimicrobianos (Da Silva et al., 2024). Para *Cff*, foi demonstrada a capacidade de formação de biofilme em condições *in vitro*, com maior tolerância de células associadas ao biofilme em comparação às células planctônicas (Harding et al., 2022), quanto em tecidos vegetais, onde a bactéria coloniza o xilema formando EPS, associados à obstrução vascular e à manifestação dos sintomas de murcha (S. Ferreira et al., 2025; Harding et al., 2022).

Nesse contexto, moléculas capazes de interferir na integridade da matriz extracelular emergem como alternativas promissoras no manejo de fitobactérias associadas à formação de biofilme. O N-acetilcisteína (NAC), um análogo da cisteína, destaca-se por sua capacidade de romper ligações dissulfeto e modular o estado redox celular (Aldini et al., 2018).

Em sistemas vegetais, a ação do NAC sobre biofilmes bacterianos foi inicialmente demonstrada em *Xylella fastidiosa* (*X. fastidiosa*), onde concentrações superiores a 1 mg mL<sup>-1</sup> reduziram a adesão celular, a formação de biofilme e a produção de EPS (Muranaka et al., 2013). Revisões recentes consolidam esses achados ao descrever o NAC como molécula multifuncional com ação antioxidante, quelante e antibiofilme, ressaltando seu potencial como ferramenta sustentável para o manejo de doenças bacterianas na agricultura (Dos Santos et al., 2025).

Considerando a importância da formação de biofilme na patogenicidade de *Cff* e as limitações das estratégias atuais de controle, a investigação do potencial do NAC como agente antibacteriano e antibiofilme representa uma abordagem inovadora e cientificamente fundamentada para o manejo da murcha bacteriana do feijoeiro.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### O feijoeiro comum: importância agronômica, econômica e alimentar

A produção mundial de feijão supera 27 milhões de toneladas anuais, com destaque para países das Américas e da Ásia (**Figura 1A**). Dados recentes indicam que o Brasil está entre os principais produtores globais, ocupando as primeiras posições no ranking mundial (**Figura 1B**), o que evidencia sua relevância estratégica no cenário produtivo internacional (Sarkar et al., 2026).

A produção nacional é distribuída em três safras ao longo do ano agrícola — safra das águas, safra da seca e safra de inverno — o que confere regularidade de oferta e flexibilidade de cultivo em diferentes regiões (A. Ferreira et al., 2025). Observa-se ampla heterogeneidade nos sistemas produtivos, em áreas de agricultura familiar ou com menor nível tecnológico, a produtividade média pode situar-se em torno de 700–800 kg ha<sup>-1</sup>, enquanto em sistemas irrigados e altamente tecnológicos, especialmente com uso de pivô central, os rendimentos podem ultrapassar 4.000 kg ha<sup>-1</sup> (A. Ferreira et al., 2025).

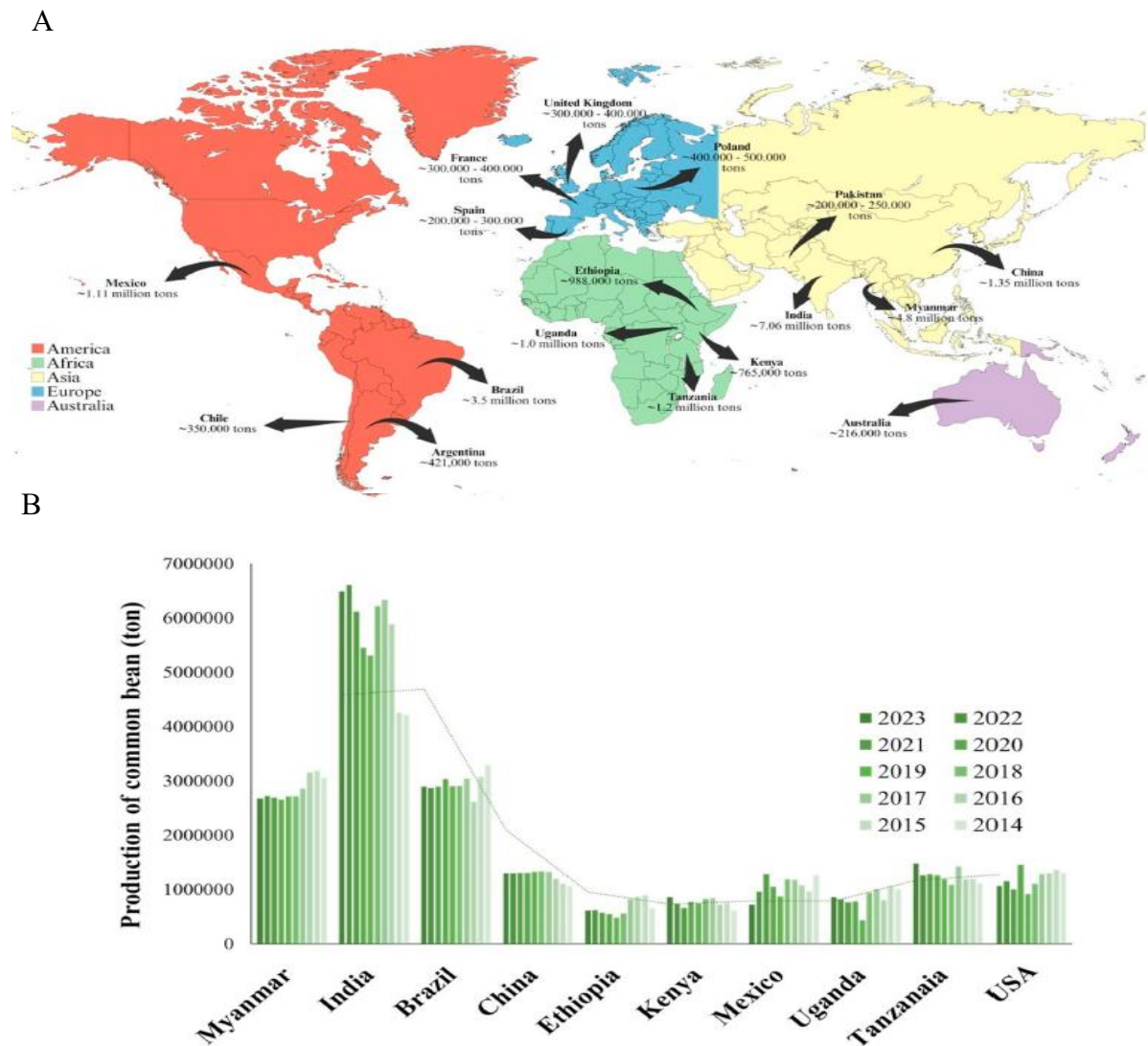
Programas de melhoramento genético conduzidos por instituições nacionais, como o Instituto Agronômico (IAC), têm contribuído significativamente para o aumento do potencial produtivo da cultura. Cultivares como IAC 2051 apresentam alto potencial de rendimento aliado à tolerância a fatores bióticos e abióticos que interferem no desenvolvimento da planta (Carbonell et al., 2021).

A escolha da cultivar IAC 2051 como material vegetal deste trabalho fundamenta-se em critérios agronômicos, tecnológicos e experimentais. Trata-se de uma cultivar do tipo carioca, de preferência do mercado consumidor brasileiro, para o qual a manutenção de grãos claros no pós-colheita tem relevância comercial. Estudos indicam que consumidores associam o escurecimento do tegumento a grãos “velhos” e de cozimento mais difícil, o que torna o escurecimento pós-colheita um atributo determinante de aceitação e valor de mercado (Silva et al., 2008).

Do ponto de vista do desempenho agronômico, o IAC 2051 apresenta alto potencial produtivo e boa qualidade tecnológica. Em ensaios de Valor de Cultivo e Uso (VCU) conduzidos em múltiplos ambientes, a cultivar registrou produtividade média de 4.492 kg ha<sup>-1</sup> em Patrocínio (MG), na safra das águas de 2022 (Carbonell et al., 2025). Além disso, apresenta massa de 1.000 sementes em torno de 300 g, hábito de crescimento tipo II (semi-ereto) e ciclo

médio de aproximadamente 85 dias (Carbonell et al., 2021). Esses atributos favorecem tanto sua adoção em sistemas produtivos quanto sua utilização em experimentos por permitir bom estabelecimento, uniformidade e produção de biomassa e grãos.

Ainda assim, mesmo cultivares com bom potencial genético podem ter o desempenho fortemente condicionado por manejo, disponibilidade hídrica e estresses bióticos e abióticos, o que contribui para variações de produtividade e reforça a necessidade de estratégias integradas de manejo (Karavidas et al., 2022). Essa variabilidade produtiva evidencia o potencial de incremento ainda existente na cultura, bem como a necessidade de estratégias integradas de manejo (A. Ferreira et al., 2025)



**Figura 1.** Distribuição geográfica e produção mundial de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). (A) Distribuição geográfica e estimativas de produção do feijão comum em diferentes continentes, com destaque para os principais países produtores. (B) Dez maiores países de feijão comum ao longo da última década, com base em dados do FAOSTAT (2023). Adaptado de Sarkar et al. (2026), com base em dados do FAOSTAT (2023).

## Desafios fitossanitários na cultura do feijoeiro

A produtividade do feijoeiro é fortemente influenciada pela ocorrência de doenças causadas por vírus, fungos e bactérias, que comprometem tanto o rendimento quanto a qualidade comercial dos grãos. Entre as viroses, o mosaico comum do feijoeiro (BCMV) destaca-se pela ampla distribuição e pelo potencial de causar reduções expressivas na produtividade, podendo resultar em perdas significativas dependendo da estirpe viral e da suscetibilidade do genótipo (Tang; Feng, 2023).

Entre as doenças fúngicas, a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) é uma das mais severas, especialmente em condições de elevada umidade, sendo caracterizada por lesões necróticas em folhas, hastes e vagens, com impacto direto sobre o enchimento de grãos e a qualidade final da produção (Nisa et al., 2024).

No grupo das causadas por bactérias, destacam-se a mancha bacteriana comum (*Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* e *X. citri* pv. *fuscans*) e, de forma crescente, a murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*). Enquanto a mancha bacteriana afeta predominantemente tecidos foliares (Valentini et al., 2010), a murcha bacteriana apresenta caráter sistêmico e vascular, conferindo-lhe maior potencial de comprometimento da planta como um todo (O'Leary; Gilbertson, 2020).

A murcha bacteriana destaca-se por provocar sintomas como clorose, murcha progressiva, necrose vascular e redução do vigor das plantas, podendo resultar em perdas expressivas de produtividade (Harding et al., 2022). Além disso, a transmissão via sementes e a capacidade de sobrevivência em resíduos culturais favorecem sua disseminação e persistência nos sistemas produtivos (Valdo et al., 2023).

O impacto econômico assume relevância particular quando associado à transmissão via sementes e à persistência do patógeno no ambiente produtivo. No caso de *Cff*, surtos epidêmicos têm sido associados à murcha progressiva e queda de produtividade, além de alterações na qualidade fisiológica das sementes (Osdaghi et al., 2020).

A murcha bacteriana pode ocasionar redução significativa no desenvolvimento das plantas e no rendimento final da cultura (Puia et al., 2021). Diante desse cenário, o desenvolvimento de cultivares resistentes tem sido amplamente explorado como estratégia de mitigação da murcha bacteriana. Contudo, a diversidade genética de *Cff*, associada ao surgimento de novas variantes e à expansão geográfica do patógeno, impõe desafios contínuos ao manejo baseado exclusivamente em resistência genética (Osdaghi et al., 2020).

## A murcha bacteriana do feijoeiro

A murcha bacteriana do feijoeiro foi descrita inicialmente nos Estados Unidos na década de 1920, associada a surtos severos em cultivos comerciais de *Phaseolus vulgaris* (Osdaghi et al., 2020). Desde então, a doença passou a ser registrada em diferentes continentes, incluindo América do Norte, América do Sul, Europa, Ásia e África, evidenciando ampla distribuição geográfica. Além da ocorrência em feijoeiro, o patógeno apresenta ampla gama de hospedeiros dentro da família Fabaceae e pode infectar outras espécies cultivadas e plantas espontâneas, favorecendo sua persistência no agroecossistema (Osdaghi et al., 2020).

A *Cff* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbia, pertencente à família Microbacteriaceae, ordem *Actinomycetales*, caracterizada por células em forma de bastonetes curtos, com morfologia coryneforme (Osdaghi et al., 2020). Trata-se de um patógeno vascular, cuja principal característica epidemiológica é a capacidade de colonizar o sistema xilemático do feijoeiro. Após penetrar nos tecidos vegetais, a bactéria alcança os vasos condutores e se multiplica no interior do xilema, disseminando-se sistemicamente ao longo da planta (Tokmakova et al., 2024).

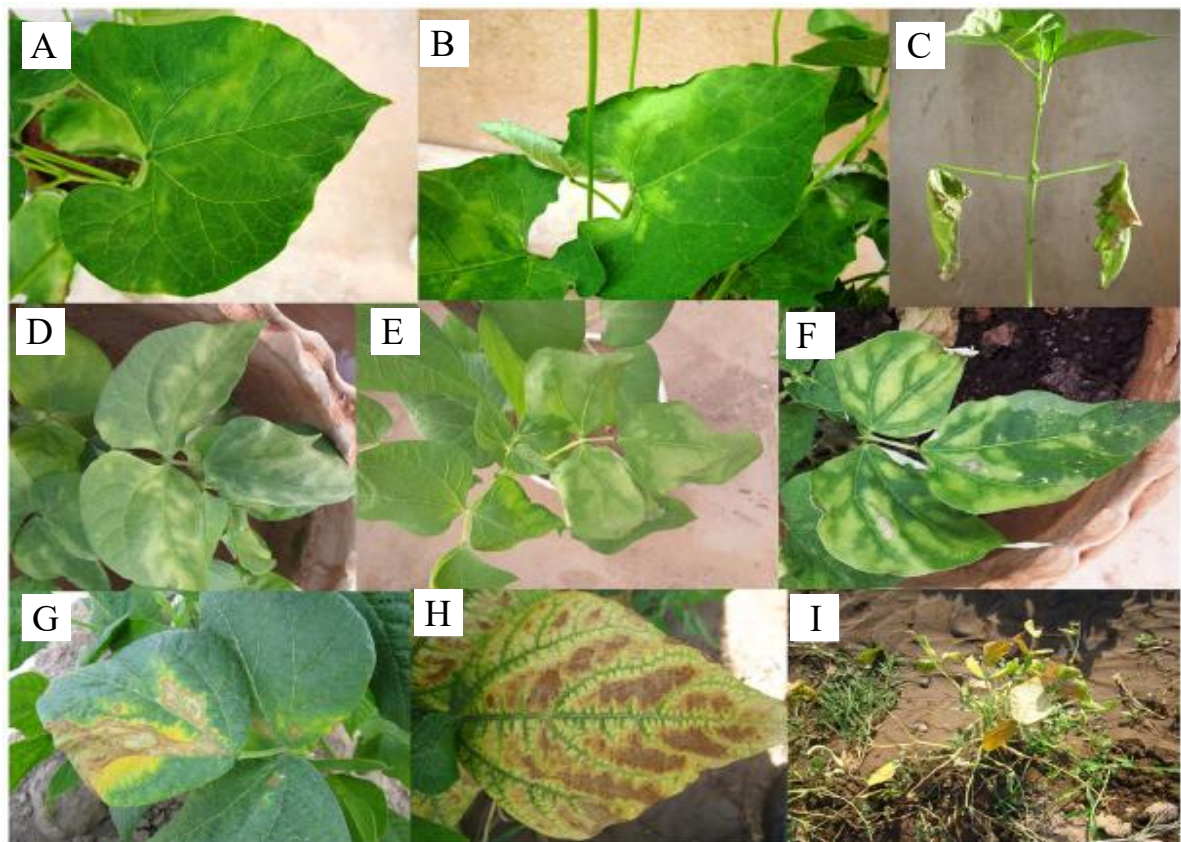
A colonização vascular está associada à formação de agregados bacterianos e produção de EPS, observadas em estudos microscópicos como estruturas compatíveis com biofilme no interior dos vasos. Essa organização estrutural contribui para a obstrução parcial ou total do fluxo de água, constituindo o principal mecanismo fisiopatológico relacionado à murcha (Harding et al., 2022).

Os sintomas iniciam-se com clorose internerval e perda temporária de turgidez, especialmente sob condições de maior demanda hídrica. À medida que a colonização vascular progride, observa-se murcha persistente, necrose foliar, nanismo e, em casos severos, morte da planta (**Figura 2 A-I**) (Harding et al., 2022; Osdaghi et al., 2020; Valdo et al., 2023).

Fatores ambientais também influenciam a severidade da doença, temperaturas moderadas a elevadas, associadas à alta umidade, favorecem a infecção e a progressão dos sintomas. Além disso, danos mecânicos decorrentes de práticas culturais, estresse hídrico ou ataque de insetos podem facilitar a penetração do patógeno nos tecidos vegetais (Osdaghi et al., 2020).

Atualmente, o manejo da murcha bacteriana baseia-se predominantemente em estratégias preventivas, uma vez que não há medidas eficazes após a colonização vascular. O

uso de sementes certificadas e livres do patógeno constitui a principal prática recomendada para reduzir a introdução do inóculo na área (S. Ferreira et al., 2025). Medidas complementares incluem rotação de culturas com espécies não hospedeiras, eliminação de restos culturais infectados e adoção de práticas que minimizem ferimentos mecânicos (Harding et al., 2022). Dessa forma, o controle da doença permanece desafiador, especialmente em sistemas intensivos de produção, nos quais as condições ambientais favorecem a manutenção do patógeno no agroecossistema.



**Figura 2.** Sintomas da murcha bacteriana do feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff). Os sintomas iniciais manifestam-se como áreas cloróticas internervais nas folhas (A, B), evoluindo para murcha foliar (C) e regiões flácidas ou com perda de turgidez nos limbos foliares (D, E). Posteriormente, observa-se necrose tecidual delimitada por margens cloróticas (F–H). Em infecções severas, ocorre murcha generalizada, desfolha e morte da planta (I). Adaptado de Osdaghi et al. (2020).

### **Biofilmes bacterianos**

A formação de biofilme constitui uma estratégia amplamente difundida entre microrganismos, incluindo bactérias fitopatogênicas, e está associada à colonização, persistência e maior sucesso ecológico em diferentes ambientes (Harding et al., 2022). Biofilmes correspondem a comunidades estruturadas de células microbianas aderidas a

superfícies bióticas ou abióticas, envoltas por uma matriz extracelular autoproduzida composta predominantemente por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelulares (Da Silva et al., 2024).

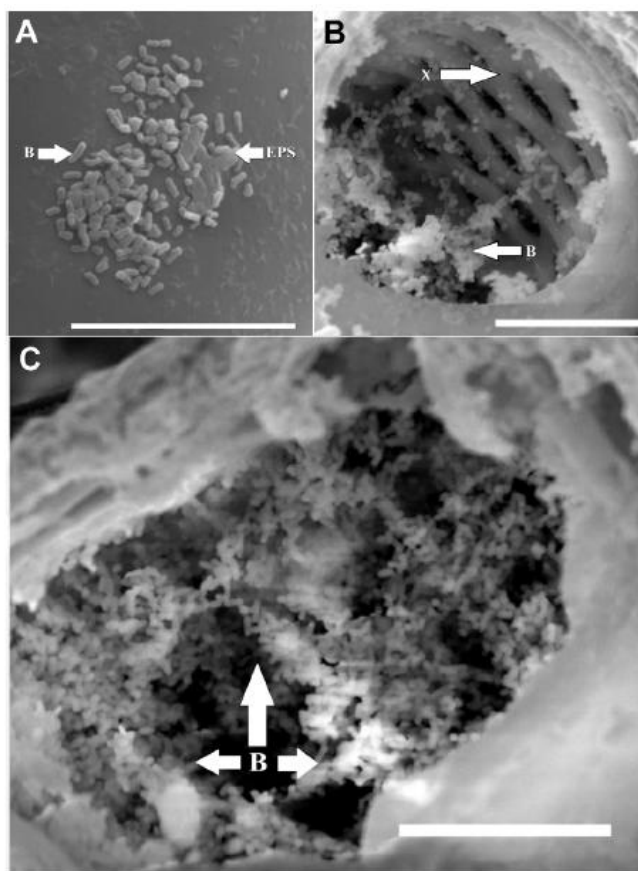
A organização em biofilme promove alterações fenotípicas importantes, incluindo aumento da tolerância a estresses físicos e químicos, maior resistência a antimicrobianos e proteção frente a variações ambientais (Stewart et al., 2019). Essas características tornam o biofilme um componente central na persistência de microrganismos em ambientes agrícolas e no interior de tecidos vegetais (Valdo et al., 2023). Evidências experimentais demonstram que a organização estrutural pode variar conforme o ambiente, movimentações dos nutrientes e o hospedeiro, sendo frequente a formação de agregados tridimensionais não aderidos a superfícies contínuas, especialmente em sistemas clínicos e vegetais (Sauer et al., 2022).

A matriz extracelular desempenha o papel central na força de adesão celular, na retenção de água e nutrientes e na modulação da dispersão de compostos no interior da comunidade (Stewart et al., 2019). Em estudos conduzidos com *X. fastidiosa*, foi demonstrado que diferentes frações de EPS apresentam distribuição espaço-temporal específica ao longo do ciclo de desenvolvimento do biofilme. Na fase inicial, proteínas localizadas na região polar da célula mediam interações eletrostáticas responsáveis pela adesão reversível. À medida que o biofilme progride, ocorre acúmulo de EPS, favorecendo a agregação celular, enquanto outras frações de EPS contribuem para a estabilidade estrutural durante a maturação (Janissen et al., 2015).

Em fitobactérias, a formação de biofilme está diretamente associada à colonização de tecidos vegetais e à expressão de virulência. Bactérias fitopatogênicas frequentemente colonizam espaços intercelulares e vasos do xilema, onde a agregação celular e a produção de matriz contribuem para a obstrução do fluxo hídrico e para o estabelecimento de sintomas como murcha e necrose (Carezzano et al., 2023). No contexto da murcha bacteriana do feijoeiro, *Cff* apresenta capacidade de formar biofilme em diferentes fases do ciclo da doença, sendo no tegumento e nos vasos do xilema (**Figura 3**), indicando que essa estratégia pode estar envolvida não apenas na colonização vascular, mas também na sobrevivência e disseminação do patógeno (Harding et al., 2022).

A transição do estado planctônico para o estado biofilme envolve a participação de estruturas celulares especializadas e sistemas regulatórios complexos. Em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, mutações em genes relacionados ao flagelo resultaram em comprometimento da formação de biofilmes maduros e na redução da severidade da doença, indicando que a motilidade flagelar participa tanto da colonização inicial quanto da organização estrutural do biofilme (Malamud et al., 2011).

A formação de biofilme de *Cff* no xilema do feijoeiro contribui diretamente para a obstrução do fluxo hídrico e intensificação dos sintomas de murcha, além de favorecer a persistência bacteriana frente a medidas de controle (Valdo et al., 2023). Dessa forma, o biofilme não representa apenas um estágio estrutural da infecção, mas um fator determinante na virulência, agressividade e dificuldade de manejo da murcha bacteriana. A compreensão dos mecanismos envolvidos na formação e manutenção dessa matriz extracelular torna-se, portanto, fundamental para o desenvolvimento de estratégias alternativas de controle direcionadas à desestruturação do biofilme e à redução da viabilidade bacteriana.



**Figura 3.** Micrografias de varredura (MEV) evidenciando a presença de *Cff* e substância polimérica extracelular (EPS) em tecidos foliares. (A) Superfície da folha com agrupamentos de bactérias (seta B) aderidas ao tecido e envoltas por EPS (seta EPS). (B) Interior de um vaso de xilema (seta X) mostrando colônias bacterianas (seta B). (C) Interior de um vaso de xilema com bactérias (seta B) formando uma estrutura compatível com biofilme. B = bactéria; EPS = substância polimérica extracelular; X = xilema. Barras de escala = 10  $\mu$ m. (Harding et al., 2022)

### Estresse oxidativo nas interações planta-patógeno

A interação entre plantas e fitopatógenos desencadeia uma série de respostas metabólicas e moleculares que contribuem para a ativação do sistema de defesa vegetal. Entre os eventos mais precoces está a rápida produção de espécies reativas de oxigênio (ROS),

caracterizando a chamada “explosão oxidativa”, que ocorre logo após o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno por receptores de reconhecimento da planta, caracterizando como a primeira resposta de defesa da planta (Sahu et al., 2022).

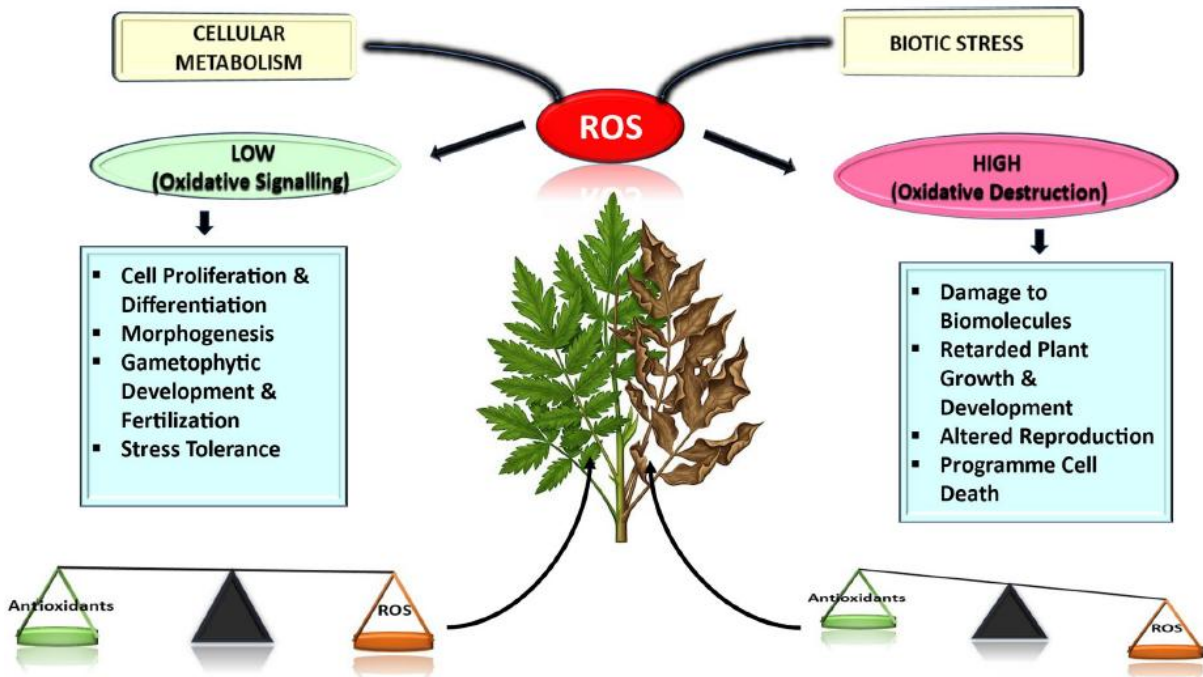
Os ROS fazem parte de um conjunto de moléculas reativas derivadas do oxigênio molecular, incluindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila (OH) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (Zheng et al., 2025). Em condições fisiológicas normais, pequenas quantidades do ROS são produzidas como subprodutos do metabolismo aeróbico em compartimentos como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos. Nessas concentrações controladas, as ROS desempenham papel central na sinalização celular, modulando processos como crescimento, fechamento estomático e ativação de genes de defesa (Sood, 2025).

Entretanto, em condições de estresse biótico, o reconhecimento de moléculas associadas ao patógeno desencadeia a ativação de enzimas como NADPH oxidases, que estão localizadas na membrana plasmática. Essas enzimas catalisam a transferência de elétrons do citosol para o espaço apoplástico, promovendo a formação de  $O_2^-$ , que é convertido em  $H_2O_2$  de forma rápida (Zheng et al., 2025). O  $H_2O_2$ , devido à sua maior estabilidade e capacidade de difusão através de membranas, atua como importante mensageiro secundário, ativando cascatas de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), modulando níveis citosólicos de  $Ca^{2+}$  e regulando fatores de transcrição associados à defesa (Sood, 2025).

Contudo, quando a produção de ROS excede a capacidade antioxidante celular, instala o estresse oxidativo (**Figura 4**). Nessa condição, o acúmulo dessas espécies altamente reativas passa a provocar danos estruturais em biomoléculas essenciais da célula vegetal. Um dos principais alvos é a membrana lipídica, onde ocorre o processo de peroxidação lipídica. Nesse processo, radicais livres reagem com ácidos graxos presentes nas membranas celulares, desencadeando reações em cadeia que comprometem a integridade e a fluidez da membrana, afetando processos como transporte de solutos e funcionamento de organelas (Zheng et al., 2025).

As proteínas também podem sofrer oxidação de resíduos sensíveis, principalmente cisteína e metionina. A oxidação desses aminoácidos altera a estrutura tridimensional das proteínas, podendo levar à perda de atividade enzimática ou à degradação proteica. Além disso, o DNA pode ser afetado pela ação de ROS, resultando em quebras de fita simples ou dupla e na formação de bases nitrogenadas oxidadas, o que compromete a estabilidade genômica e o funcionamento celular (Zheng et al., 2025).

A Figura 4 ilustra esse duplo papel da ROS na fisiologia vegetal. Em níveis moderados, essas moléculas atuam como sinais regulatórios que ativam mecanismos de defesa e ajustam processos metabólicos. Entretanto, quando acumuladas em excesso durante situações de estresse intenso, as ROS passam a exercer efeito citotóxico, resultando em danos oxidativos e comprometimento do crescimento.



**Figura 4.** Representação esquemática do papel duplo das espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas. Em níveis baixos ou moderados, as ROS atuam como moléculas sinalizadoras, regulando processos como proliferação e diferenciação celular, morfogênese, desenvolvimento reprodutivo e tolerância ao estresse. Em contrapartida, o acúmulo excessivo de ROS sob estresse biótico ou metabólico leva ao estresse oxidativo, caracterizado por danos a biomoléculas, comprometimento do crescimento, desenvolvimento vegetal e alterações reprodutivas. Adaptado de Sood (2025).

Para evitar esse desbalanço redox, as plantas desenvolveram um sistema antioxidante coordenado, composto por componentes enzimáticos e não enzimáticos capazes de neutralizar ou converter espécies reativas de oxigênio em moléculas menos reativas (Rao et al., 2025; Cannea & Padiglia, 2025). Entre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD) constitui uma das primeiras linhas de defesa contra o estresse oxidativo, catalisando o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), representando uma etapa central no controle da produção de espécies reativas de oxigênio no metabolismo celular (Zheng et al., 2025).

O peróxido de hidrogênio produzido pela ação da SOD, embora mais estável que o superóxido, ainda pode causar danos celulares quando acumulado em níveis elevados. Dessa

forma, sua remoção ocorre por meio de enzimas como a ascorbato peroxidase (APX), que utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir o  $H_2O_2$  a água. Esse processo integra o chamado ciclo ascorbato–glutathiona, um dos principais sistemas de detoxificação de ROS em plantas (Cannea & Padiglia, 2025).

Nesse contexto, compostos contendo grupos sulfidríla (-SH) podem atuar como importantes moduladores do estado redox celular. Entre eles destaca-se o N-acetilcisteína (NAC), uma molécula derivada da cisteína que apresenta potencial antioxidante e capacidade de atuar como precursora da síntese de glutathiona reduzida (GSH) (Aldini et al., 2018). O NAC pode fornecer cisteína para a formação de GSH, um dos principais antioxidantes celulares, contribuindo para o funcionamento de sistemas dependentes de glutathiona envolvidos na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (Sakamoto & Suzuki, 2024).

Dessa forma, a presença de compostos antioxidantes pode contribuir para a manutenção do equilíbrio redox celular durante situações de estresse biótico, reduzindo o acúmulo excessivo de ROS e limitando os danos oxidativos em tecidos vegetais. Em sistemas agrícolas, a aplicação de moléculas com propriedades antioxidantes tem sido investigada como estratégia para mitigar os efeitos do estresse oxidativo em plantas submetidas a diferentes tipos de estresse, incluindo a infecção por fitopatógenos (Sakamoto & Suzuki, 2024).

Entre essas moléculas, o NAC tem despertado interesse devido à sua dupla atuação. Além de participar da modulação do estado redox celular, o NAC também pode interferir em processos associados à virulência bacteriana, como a formação de biofilmes, contribuindo potencialmente para a redução da colonização de tecidos vegetais por determinados patógenos (Santos et al., 2025). Dessa forma, o uso do NAC tem sido explorado como uma abordagem promissora para reduzir danos oxidativos e auxiliar no manejo de doenças em sistemas agrícolas.

### **N-acetilcisteína (NAC) como agente antibiofilme e antioxidante**

O NAC é um derivado acetilado do aminoácido L-cisteína, largamente conhecido na medicina humana como mucolítico e modulador do estresse oxidativo. Do ponto de vista molecular, seus principais mecanismos envolvem: 1) doação de grupamentos sulfidríla (-SH), atuando como precursor de glutathiona reduzida (GSH); 2) ação direta como antioxidante em determinadas espécies reativas; e 3) quebra de pontes de dissulfeto em proteínas e polímeros ricos em cisteína, o que explica o efeito mucolítico e a capacidade de desestabilizar matrizes de

biofilme (Aldini et al., 2018). O NAC é descrito como molécula multifuncional, com propriedades antioxidantes, antimicrobianas, quelantes de metais e potencial para integrar estratégias sustentáveis de manejo de estresses bióticos e abióticos (dos Santos et al., 2025).

No contexto vegetal, o NAC tem sido utilizado como modulador do estresse oxidativo em diferentes espécies. Em mudas de alface transplantadas para sistema hidropônico, a aplicação do NAC reduziu o acúmulo de  $H_2O_2$  nas raízes, diminuiu a peroxidação lipídica e melhorou o aumento de fenóis totais após o estresse de transplante, resultando em maior crescimento da parte aérea e raízes (Sakamoto & Suzuki, 2024). Indicando que o NAC pode atuar como antioxidante direto, removendo o  $H_2O_2$ , e indiretamente, modulando o estado redox e a resposta metabólica ao estresse (dos Santos et al., 2025).

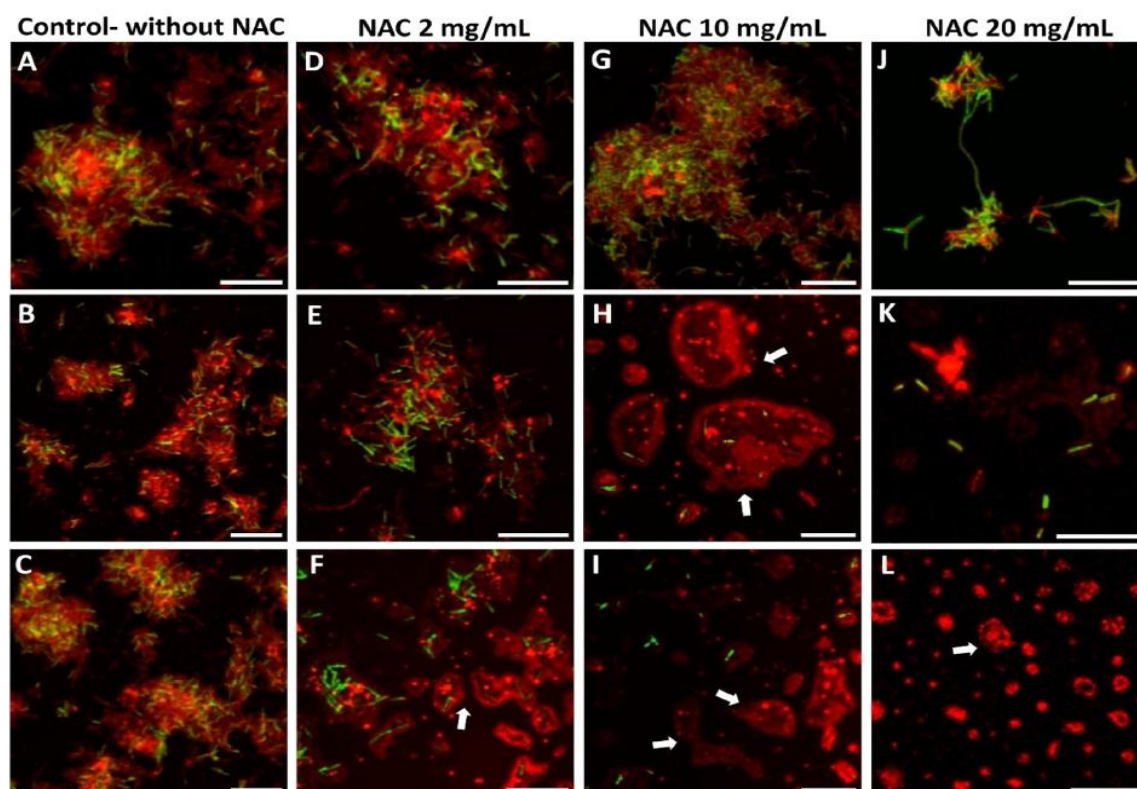
O efeito antioxidante do NAC pode ser compreendido em múltiplos níveis. Em primeiro lugar, por possuir um grupo tiol (-SH), o NAC pode atuar como agente redutor e neutralizar oxidantes em determinadas condições (Aldini et al., 2018). Entretanto, em plantas, sua contribuição mais relevante tende a ocorrer de forma indireta, ao favorecer o pool celular de tióis e a disponibilidade de cisteína, sustentando a síntese e a reciclagem de glutathione reduzida (GSH), componente central das redes de manutenção da homeostase redox (Sahu et al., 2022). Em patossistemas, isso é particularmente importante porque a produção de ROS integra a resposta imune como sinalização inicial, mas, quando excede a capacidade antioxidante, resulta em estresse oxidativo e danos a biomoléculas (Cannea & Padiglia, 2025). Assim, ao modular o balanço redox, o NAC pode reduzir marcadores de dano oxidativo e ajustar a atividade de enzimas detoxificantes de ROS, sem necessariamente suprimir completamente a sinalização oxidativa (Zheng et al., 2025).

Em patossistemas envolvendo *X. fastidiosa* o NAC tem sido explorado como ferramenta para reduzir a carga bacteriana e, simultaneamente, mitigar o estresse oxidativo na planta hospedeira. Estudos envolvendo plantas cítricas com clorose variegada dos citros (CVC) demonstraram que o NAC é absorvido pelas raízes, translocado para partes aéreas e capaz de reduzir em até 60 vezes a população de *X. fastidiosa*, além de diminuir o número de vasos do xilema obstruídos por biofilmes bacterianos (Picchi et al., 2024). Esses efeitos foram acompanhados por aumento da atividade de enzimas de detoxificação, redução de marcadores de estresse oxidativo e incremento na produtividade de frutos em condições de campo, caracterizado um efeito duplo, antimicrobiano e antioxidante (Picchi et al., 2024).

No que se refere à interação com biofilmes de fitopatógenos, o NAC tem sido amplamente estudado em *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico. Em

ensaios *in vitro*, concentrações a partir de 1-2 mg mL<sup>-1</sup> reduziram a adesão celular a superfícies, a formação de biofilme e a produção de expolissacarídeos, além de afetar viscosidade e a motilidade bacteriana (Picchi et al., 2016).

Avanços recentes ajudaram a esclarecer os mecanismos de desestruturação de biofilmes bacterianos pelo NAC. Em biofilmes de *X. fastidiosa*, análises de alta resolução mostraram que o NAC modifica o biofilme condicionante da superfície, rompe frações de EPS promovendo a liberação de células aderidas, reduz o volume de EPS ligado e induz alterações em suas estruturas, liberando às células aderidas (Figura 5) (da Silva et al., 2024).



**Figura 5.** Imagens de microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) mostrando a fusão dos canais fluorescentes GFP (bactérias, verde) e Texas-Red (matriz extracelular – EPS, vermelho) em biofilmes de *Xylella fastidiosa* após 12 h de crescimento. Amostras controle sem NAC (A–C) e amostras tratadas com N-acetilcisteína por 2 h nas concentrações de 2 mg mL<sup>-1</sup> (D–F), 10 mg mL<sup>-1</sup> (G–I) e 20 mg mL<sup>-1</sup> (J–L). Observa-se redução progressiva da organização estrutural do biofilme e liberação de células isoladas e pequenos agregados com o aumento da concentração de NAC. As setas brancas indicam regiões com estruturas de EPS sugerindo desestruturação da matriz e desprendimento celular. Barra de escala = 20 µm. Adaptado de da Silva et al. (2024).

Em *X. citri subsp. citri*, análises metabolômicas baseadas em GC-TOF/MS trouxeram evidências sobre os efeitos intracelulares do NAC. Em presença da molécula, a proliferação celular foi reduzida após 4 h de exposição, enquanto danos à membrana foram observados apenas após 24 h, sugerindo que alterações metabólicas antecedem o comprometimento estrutural (Picchi et al., 2021). O tratamento com NAC alterou o metabolismo da cisteína e resultou no desaparecimento de glutamina detectável, essa reorganização metabólica aponta

que o NAC é metabolizado pela bactéria e que a redução na disponibilidade de aminoácidos impacta a síntese proteica e, conseqüentemente, a capacidade de formar biofilmes (Picchi et al., 2021).

Embora a maioria dos estudos em fitopatologia envolva bactérias Gram-negativas, há evidências consistentes da atividade antibiofilme do NAC contra bactérias Gram-positivas em outros sistemas. Em *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas resistentes à meticilina, o NAC reduziu crescimento e formação de biofilme, além de apresentar efeito sinérgico quando combinada com carvacrol (Pazarci et al., 2024). De forma semelhante, o NAC inibiu crescimento, adesão e biofilme de diferentes patógenos Gram-positivos, como *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* e *Corynebacterium spp.*, com efeito dependente de dose e tempo (Eroshenko et al., 2017). Embora ainda não existam estudos específicos com fitobactérias Gram-positivas, como *Cff*, os resultados obtidos em modelos clínicos indicam potencial aplicação do NAC contra biofilmes desse patógeno agrícola.

Como antioxidante, contribui para o estado redox celular, modulando a produção e a remoção de ROS e influenciando vias de sinalização associadas à resposta de defesa (Sakamoto & Suzuki, 2024). Como agente antibiofilme, desorganiza a matriz de EPS por quebra de pontes de dissulfeto, altera o filme condicionante de superfícies, interfere na motilidade e adesão bacteriana e promove a reconfiguração metabólica que reduz a síntese proteica e a viabilidade de células em agregados (da Silva et al., 2024). Em fitopatógenos Gram-negativos já estudados, essa combinação de efeitos resulta em menor colonização epifítica, menor obstrução dos vasos do xilema e redução da severidade de sintomas (Picchi et al., 2024). Em bactérias Gram-positivas, principalmente de importância médica, o NAC mostra capacidade de inibir o crescimento e biofilme, isoladamente ou em associação com outros agentes (Eroshenko et al., 2017; Petkova et al., 2023), o que reforça seu potencial para ser testado em patossistemas agrícolas envolvendo Gram-positivos.

Considerando o papel central do estresse oxidativo nas interações planta-patógeno e a relevância do efeito antibiofilme em bactérias, o NAC surge como molécula inovadora para estudos com fitopatógenos. A avaliação de seus efeitos sobre biofilmes de bactérias Gram-positivas de importância agrícola, bem como sobre o balanço redox do hospedeiro, pode contribuir para preencher lacunas existentes na literatura e fundamentar o desenvolvimento de estratégias de controle mais sustentáveis e eficientes, alinhadas às demandas atuais de produção agrícola.

## **HIPÓTESE**

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* forma biofilme nos vasos do xilema e o N-acetilcisteína pode desestruturar esse biofilme e reduzir os sintomas da murcha bacteriana do feijoeiro.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Avaliar o potencial do N-acetilcisteína (NAC) no controle de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), através do efeito sobre o crescimento bacteriano, formação de biofilme e desenvolvimento da murcha bacteriana do feijoeiro comum.

### **Objetivos específicos**

#### **1.1 Capítulo 1 - N-Acetylcysteine Inhibits Growth and Biofilm Development of the Gram-Positive Plant-Pathogen *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***

- Validar primers específicos para detecção molecular de *Cff* por PCR.
- Determinar o crescimento bacteriano e tempo de geração de *Cff*.
- Quantificar o efeito inibitório e bactericida do NAC sobre *Cff*.
- Avaliar a capacidade de *Cff* em formar biofilme em superfície abiótica e caracterizar sua estrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Determinar o impacto do NAC na formação do biofilme de *Cff*.

#### **1.2 Capítulo 2 - Avaliação do N-acetilcisteína no manejo da murcha bacteriana do feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens***

- Estabelecer a concentração de inoculação de *Cff* em plantas de feijoeiro.
- Quantificar a progressão da doença por meio da severidade e AUDPC.
- Confirmar a ocorrência de biofilme em tecido vegetal infectado por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Avaliar o efeito do NAC na redução da severidade da murcha bacteriana em casa de vegetação e campo.
- Determinar o efeito do NAC na redução do estresse oxidativo associado à infecção.

## Capítulo 1- *N*-Acetylcysteine Inhibits Growth and Biofilm Development of the Gram-Positive Plant Pathogen *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

Vinicius V. Ferreira<sup>1,2</sup>, Maria Julia Franzini<sup>3</sup>, Simone C. Picchi<sup>3</sup>, Patricia Duarte de Almeida<sup>5</sup>, Monica A. Cotta<sup>5</sup>, César Júnior Bueno<sup>2,4</sup>, Sergio A. Carbonell<sup>2</sup>, Alisson F. Chiorato<sup>2</sup>, Alessandra A. Souza<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Citrus Research Center Sylvio Moreira (CCSM) – Agronomic Institute (IAC), Cordeirópolis, Brazil

<sup>2</sup> Center of Fiber and Grain/Campinas Experimental Center (CEC)- Agronomic Institute (IAC) Campinas, SP, Brazil

<sup>3</sup> Startup CiaCamp - Cordeirópolis, SP, Brazil

<sup>4</sup> CAPSA-IB, Phytopathology Laboratory – Campinas, Brazil

<sup>5</sup> Applied Physics Department, Institute of Physics 'Gleb Wataghin', University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

### ABSTRACT

*This study establishes baseline in vitro growth and biofilm-development parameters for the Gram-positive bean pathogen Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens (Cff) and evaluates N-acetylcysteine (NAC) as an antimicrobial/antibiofilm agent. The isolate (IBSBF 2869) was molecularly confirmed (tlsp PCR and 16S rRNA). In NBY medium at 28 °C, Cff showed a lag phase up to 14 h, exponential growth from 14 to 51 h and an estimated generation time 6.8 h. NAC inhibited growth in a concentration-dependent manner, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 8 mg mL<sup>-1</sup> and a minimum bactericidal concentration (MBC) of 20 mg mL<sup>-1</sup>; viable counts decreased sharply at 8–18 mg mL<sup>-1</sup> and no colonies were recovered at 20 mg mL<sup>-1</sup>. Scanning electron microscopy revealed progressive biofilm organization from 24 to 72 h on abiotic surfaces, while NAC markedly impaired biofilm establishment: at 8 mg mL<sup>-1</sup> biofilm cells became undetectable at 72 h, and at 16 mg mL<sup>-1</sup> biofilm formation was fully suppressed at all time points. Overall, NAC exhibited strong inhibitory, bactericidal, and antibiofilm activity against Cff, supporting its potential as a candidate compound for managing Gram-positive phytopathogenic bacteria.*

**Keywords:** disulfide bonds, sustainability, MIC, MBC, biofilm inhibition

### 1. INTRODUCTION

The Gram-positive bacterium *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) is the causal agent of bacterial wilt in dry beans (*Phaseolus vulgaris*) by forming biofilms inside the xylem vessels, which disrupts water transport from the roots to the shoots (Osdaghi et al., 2020). Biofilm formation has been one of the most effective strategies employed by bacteria to colonize diverse microenvironments, including soil particles, rhizosphere, plants, animals, and humans (Sauer et al., 2022). Biofilms consist of an extracellular polymeric substances (EPS)

matrix produced by bacterial populations or communities to agglomerate and protect themselves against different environmental stressors (Jamal *et al.*, 2018).

Furthermore, biofilm formation has been recognized as an important factor contributing to bacterial pathogenicity and persistence in plant hosts (Valdo *et al.*, 2022). Accordingly, the success of *Cff* as a plant pathogen is closely linked to its ability to persist, disseminate, and multiply within distinct host-associated niches (Osdaghi *et al.*, 2020). The pathogen is primarily disseminated through infected seeds, which facilitates long-distance spread and early systemic colonization. Once established in the host, *Cff* colonizes the xylem vessels, where bacterial cells adhere to vessel walls and form aggregates. Such vascular colonization contributes to symptom development and disease progression, suggesting that bacterial adhesion and multicellular organization play a central role in vascular persistence (Osdaghi *et al.*, 2020; S. R. Ferreira *et al.*, 2025).

The symptoms caused by *Cff* in dry bean typically include chlorotic and necrotic lesions on the leaves, followed by systemic wilting that is often irreversible and eventually results in plant death. Under periods of warm and dry conditions, or during high humidity, stresses resulting from the presence of the pathogen induce foliar wilting symptoms, thereby impairing plant recovery (Puia *et al.*, 2021).

Dry bean is an essential crop in Brazil, cultivated across multiple production systems and seasons, with national production exceeding 2.7 million tons annually, reinforcing its economic and social importance in food security (A. L. Ferreira *et al.*, 2025). In this context, bacterial wilt represents a significant phytosanitary concern, as *Cff* is widely distributed in major bean-producing regions of the country, including Paraná, Goiás, São Paulo, Santa Catarina, and the Federal District (Puia *et al.*, 2021). Given the seed-borne nature of *Cff* and its role as a primary source of inoculum, infected seed lots represent a critical factor for disease dissemination and may contribute to production losses in major bean-growing regions (Puia *et al.*, 2021).

The bacterial wilt has progressively been recognized as a re-emerging disease, with recent reports documenting its occurrence in regions previously considered free of the pathogen, such as Bulgaria and Russia, evidencing its ability to establish in new agroecosystems (Tokmakova *et al.*, 2024; Kizheva *et al.*, 2024). This re-emergence has been closely associated with the movement of contaminated seeds and changes in agricultural practices. In addition, disease epidemics and symptom severity have frequently been reported under warm environmental conditions, suggesting that elevated temperatures favor disease development and

progression (Osdaghi et al., 2020). Although the precise effects of temperature on bacterial growth and vascular colonization remain incompletely understood, field observations consistently associate warmer climates with increased symptom expression and yield losses, highlighting the growing risk posed by this pathogen under climate change scenarios (Harding et al., 2022).

Similar to other major vascular bacterial pathogens, management strategies for this disease are primarily preventive, for the *Cff* is primarily based on the use of pathogen-free seeds to prevent the introduction of the primary source of inoculum. Additionally, a minimum two-year crop rotation with non-host species or avoiding direct succession between soybean and bean crops is crucial for reducing bacterial persistence (Osdaghi et al., 2020; Nascimento et al., 2021). In contrast, conventional chemical control strategies, including bactericidal treatments, have shown limited effectiveness and are generally considered secondary to preventive measures such as the use of pathogen-free seeds and crop rotation (Harding et al., 2022). Given the limited management approaches, the study of new control strategies is needed to impair the spread and damage caused by *Cff*.

In the context of sustainable disease management, N-acetylcysteine (NAC), a cysteine analogue primarily used in medicine (Aldini *et al.*, 2018), has recently gained attention in agriculture due to its antioxidant properties, low toxicity, and ability to effectively disrupt bacterial biofilms (Picchi et al., 2016; Qiao et al., 2021; da Silva et al., 2024). The use of NAC has been successfully applied to disrupt biofilm formation in phytopathogenic bacteria particularly *Xylella fastidiosa*, the causal agent of Citrus Variegated Chlorosis (CVC) in sweet orange (*Citrus sinensis*) (Muranaka et al., 2013). The effectiveness of NAC is especially relevant given the systemic colonization of *X. fastidiosa*, characterized by biofilms formation within xylem vessels, is a key factor in disease development. (Muranaka et al., 2013; Picchi et al., 2024).

Given the similarities in xylem colonization among these phytopathogens, this study raised the hypothesis that NAC could also be effective against *Cff*. However, fundamental information regarding the *Cff* life cycle, growth curve, and biofilm formation remains limited. Therefore, this study aimed to expand the current knowledge of *Cff* by characterizing its growth behavior and biofilm-forming capacity, and by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of NAC, as well as its effects on biofilm development, to assess the potential of NAC as a sustainable strategy for the management of bacterial wilt in dry beans.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strains and growth conditions

The *Cff* strain IBSBF 2869 used in this study was obtained from the Biological Institute – SP- Brazil (<https://regiaoocampinas.org.br/instituto-biologico/>) culture collection, access number 1337. Bacterial cultures were grown in NBY medium (Osdaghi et al., 2020). Bacterial population density was determined using the serial dilution plating method. Cultures were serially diluted in phosphate-buffered saline (PBS), ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-8}$ , and aliquots of appropriate dilutions were plated onto Nutrient Agar (NA). Plates were incubated at 28 °C for 48 h in a biochemical oxygen demand (BOD) chamber, after which colony-forming units (CFU), defined as viable cells capable of forming visible colonies, were counted. CFU mL<sup>-1</sup> values were calculated based on the dilution factor and plated volume (as described below). N-acetylcysteine (NAC; Sigma-Aldrich, purity  $\geq 99\%$ ) was prepared as a 50 mg mL<sup>-1</sup> stock solution in sterile distilled water, with the pH adjusted to 6.5.

### Molecular Identification and Validation of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.

#### *flaccumfaciens* (*Cff*)

To confirm that the obtained isolate corresponded to *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, molecular validation was performed by polymerase chain reaction (PCR). Genomic DNA was extracted from bacterial colonies using the Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), following the manufacturer's instructions. DNA concentration and purity were assessed by spectrophotometry using a NanoPhotometer N60 (Implen), and DNA integrity was verified by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide. DNA samples were stored at -20 °C until further use.

PCR amplification was carried out using the *Cff*-specific primers CFF1F (5'-GTT ATG ACT GAA CTT CAC TCC-3') and CFF1R (5'-GGA TGT TCC CGG TGT TCA GT-3'), as described by Tarakanov et al. (2023), which amplify approximately a 308 bp fragment. In addition, universal 16S rRNA primers FD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') and RD1 (5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3') were used to generate approximately 1500 bp amplicon.

PCR reactions were performed in a final volume of 10  $\mu$ L, containing 4  $\mu$ L Phusion High-Fidelity Buffer, 0.4  $\mu$ L dNTP mix, 1.25  $\mu$ L of each primer (10  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), 1.9  $\mu$ L Milli-Q water, and 1  $\mu$ L of template DNA. Amplifications were performed in a thermocycler (Thermo) under the following

conditions: initial denaturation at 98 °C for 3 min; 35 cycles of denaturation at 98 °C for 10 s, annealing at 60 °C for 40 s, and extension at 72 °C for 10 s; followed by a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide.

The corresponding amplicons were excised from the gel and purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Purified PCR products were sequenced using the BigDye® Direct Sanger Sequencing protocol on an ABI 3700 sequencer. Sequence identity was confirmed by BLAST analysis, and multiple sequence alignment was performed using MEGA version 10 software.

### **Inoculum preparation and Growth Curve analysis**

An aliquot of the *Cff* stock culture was initially grown on solid medium and subsequently inoculated into 10 mL of liquid NBY medium, followed by overnight incubation at 28 °C with agitation at 180 rpm. Bacterial growth was monitored by measuring optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) using a UV/Vis spectrophotometer (Lambda Bio; PerkinElmer), and the working suspension was adjusted to an initial OD<sub>600</sub> of approximately 1.20.

The culture was then diluted in fresh NBY medium to obtain a final concentration of 10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>. This concentration was confirmed by serial dilution, in which 0.1 mL aliquots were transferred into 0.9 mL of PBS, with successive dilutions performed up to 10<sup>-8</sup>. Subsequently, 0.01 mL of each dilution was plated onto NA. Plates were incubated at 28 °C for 48 h, after which colonies were counted and bacterial concentration was calculated using the formula: CFU mL<sup>-1</sup> = (number of colonies × dilution factor) / plated volume (0.01 mL), as described by Thomas et al. (2015).

Growth curves were determined in 96-well microplates containing 0.25 mL of bacterial suspension per well, with sterile NBY medium used as the negative control. Plates were incubated for 72 h in a Thermo Scientific Varioskan Flash Type 3001 microplate reader, with OD<sub>600</sub> measurements recorded hourly. At the end of the experiment, 0.1 mL from each well was collected, serially diluted, and plated for CFU quantification. Optical density and CFU data were used to establish correlations between bacterial population density and the different growth phases. All experiments were performed in triplicate.

### **Determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

The MIC of NAC was determined following the methodology described by Rodríguez-Melcón et al. (2022). The range of NAC concentrations tested against *Cff* was selected based on Picchi et al. (2016). Assays were performed in 96-well microplates containing bacterial suspensions subjected to the following treatments. The positive control consisted of 0.25 mL of *Cff* at  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> without NAC, whereas the treatments comprised NAC at final concentrations of 6, 8, 12, 14, 16, 18, and 20 mg mL<sup>-1</sup>. Negative control containing only NBY medium was included. Additionally, controls with *Xanthomonas citri subsp. citri* (*Xcc*) were included, as described by Picchi et al. (2016), to validate the NAC effect in our experimental design. These controls consisted of *Xcc* at  $10^4$  CFU mL<sup>-1</sup>, both in the absence and in the presence of 8 mg mL<sup>-1</sup> NAC. Plates were incubated at 28 °C for 42 h in the Varioskan reader, with OD<sub>600</sub> recorded hourly. The MIC was defined as the lowest concentration of NAC that inhibited bacterial growth after the incubation period, based on OD values. All assays were performed in triplicate, and statistical analyses were conducted using Tukey's test, with differences considered significant at  $p < 0.05$ .

### **Determination of the Minimum Bactericidal Concentration (MBC)**

The MBC of NAC was determined using serial dilution method as described above. After incubation at 28 °C for 42 hours, 0.1 mL aliquots were taken from the wells corresponding to all NAC concentrations tested, as well as from the controls, for CFU quantification. The MBC was defined as the lowest NAC concentration at which no colonies were observed under the evaluated conditions.

All assays were performed in triplicate, and statistical analyses were conducted using Tukey's test, with differences considered significant at  $p < 0.05$ .

### **Biofilm Formation and NAC effect**

Biofilm formation was evaluated on glass coverslips placed at the bottom of 24-well plates (Delta SI Multidishes, Nunc). *Cff* cultures with an initial OD<sub>600</sub> of 1.0 were adjusted to  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup> and incubated at 28 °C for 24 h in triplicate, with 2 mL per well. After incubation, the culture medium was carefully removed, and the coverslips were gently washed with autoclaved distilled water, air-dried, and sputter-coated for scanning electron microscopy (SEM). Biofilm structure and morphology were analyzed using a FEI Quanta FEG 250 SEM

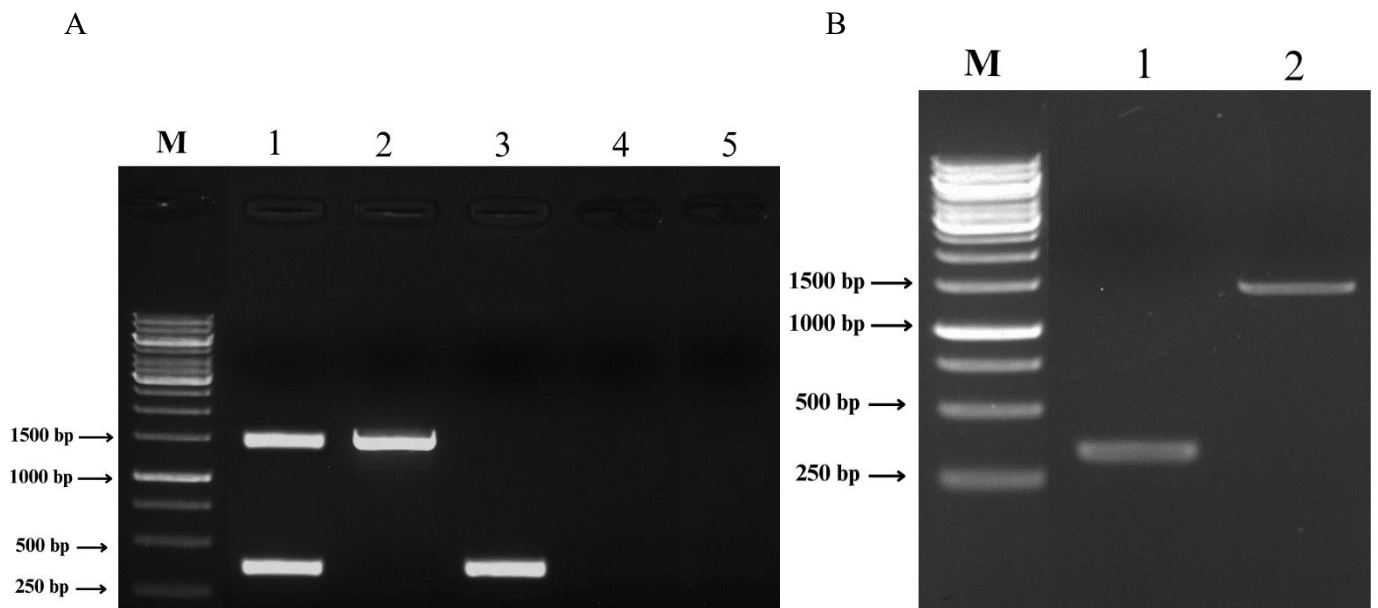
(Thermo Fisher Scientific). The bacterial cell dimensions were determined from SEM images using ImageJ software (version 1.54).

To evaluate the effect of NAC on biofilm formation, coverslips were prepared as described above and incubated for 24, 48, and 72 h under three experimental conditions: a positive control consisting of 2 mL of *Cff* at  $10^5$  CFU mL<sup>-1</sup>, and two NAC treatments at final concentrations of 8 and 16 mg mL<sup>-1</sup>. Final volumes were adjusted accordingly. Following incubation, coverslips were gently washed with sterile PBS to remove non-adherent cells. Biofilm formation and architecture were analyzed using a Hitachi TM4000Plus SEM. This model of SEM allows direct visualization of biofilms formed *in situ* on coverslips without extensive sample preparation, such as dehydration or metal coating, thereby preserving biofilm structure and minimizing imaging artifacts.

### 3. RESULTS

#### Molecular Characterization

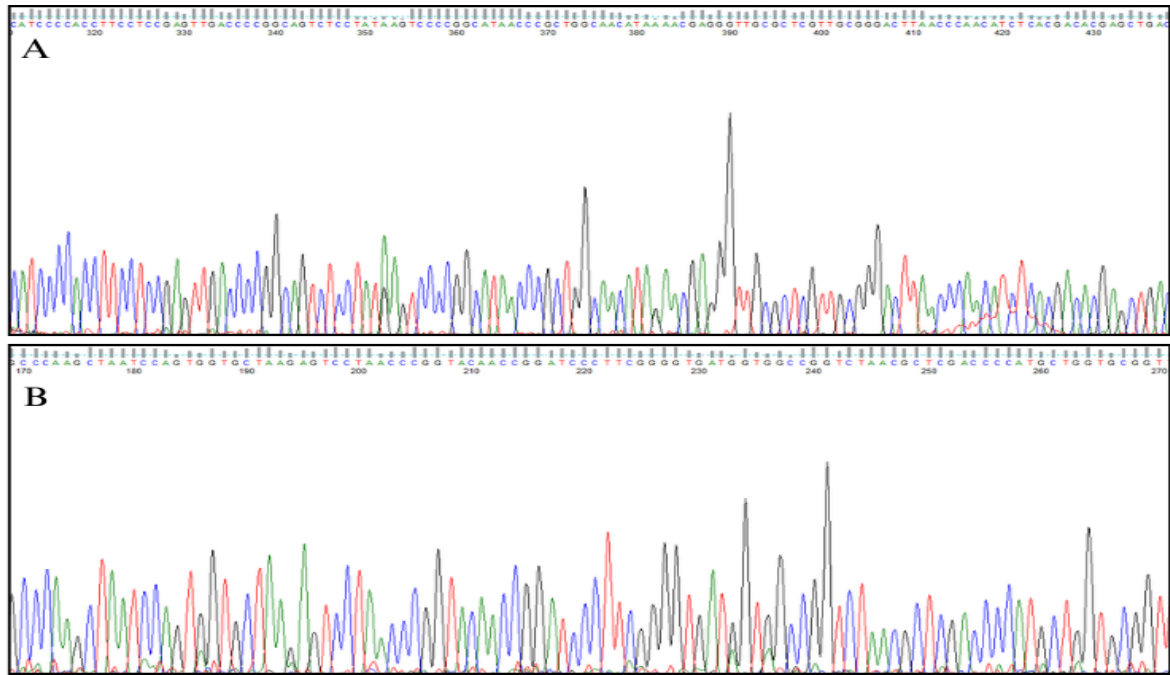
Molecular characterization was performed by PCR amplification of target genes. In Figure 1A, lanes 1 and 2 show the amplicons obtained from *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) and *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri* subsp. *citri*), as positive control, using universal 16S rRNA primers, yielding fragments of approximately 1500 bp. Lane 3 corresponds to the specific *Cff* amplicon, demonstrating that the primer pair Cff1F/Cff1R



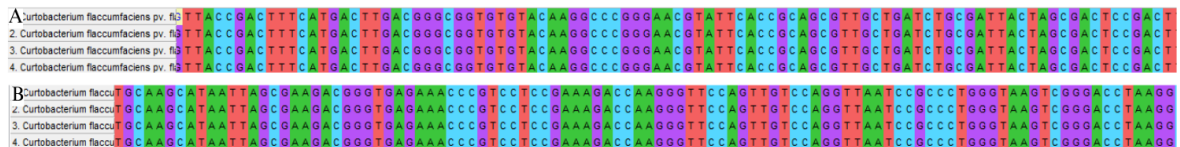
**Figure 1.** Molecular confirmation of *Cff* by 16S rRNA and *tlp* gene amplification. (A) Agarose gel (1%) showing PCR amplicons products. Lanes 1 and 2: universal 16S rRNA amplification of *Cff* and *X. citri* subsp. *citri*, respectively (~1500pb); lane 3: *Cff*-specific amplification using primers Cff1F/Cff1R (~308pb); lane 4: negative control (*X. citri* subsp. *citri* DNA amplified with *Cff*-specific primers); lane 5: no-template control (H<sub>2</sub>O). M: molecular weight marker (1kb). (B) Purified PCR products (~300 bp and 1500 bp) obtained from *Cff*.

successfully amplified the expected fragment of approximately 308 bp, corresponding to the trypsin-like serine protease (*tlsp*) gene, as previously described by Tarakanov et al. (2023). Lane 4 represents the negative control using *X. citri* subsp. *citri* DNA with the *Cff*-specific primers, and lane 5 corresponds to the no-template control (H<sub>2</sub>O), confirming amplification specificity.

In addition to the expected 16S rRNA amplicon of approximately 1500 bp, a second fragment of approximately 300 bp was consistently observed (Figure 1A, lane 1). Due to the presence of these two distinct fragments, both the ~300 bp and ~1500 bp bands were purified (Figure 1B), excised from the gel and subjected to DNA sequencing (Figure 2A, B). Sequence analysis confirmed that both fragments correspond to regions of the *Cff* 16S rRNA gene, showing high similarity to reference sequences deposited in public databases (Figure 3A, B).



**Figure 2.** Electropherograms obtained from partial 16S rRNA gene sequencing of *Cff*. (A) Sequence chromatogram corresponding to the ~1500 bp amplicon. (B) Sequence chromatogram corresponding to the ~300 bp amplicon. Well-defined peaks and minimal background signal indicative high sequencing quality and reliable base calling.



**Figure 3.** Multiple sequence alignment of partial 16S rRNA gene sequences obtained from *Cff* and reference sequences retrieved from the NCBI GenBank database. (A) Alignment corresponding to the ~1500 bp amplicon. (B) Alignment corresponding to the ~300 bp amplicon. High nucleotide conservation among sequences supports the taxonomic identity of the isolate analyzed in this study.

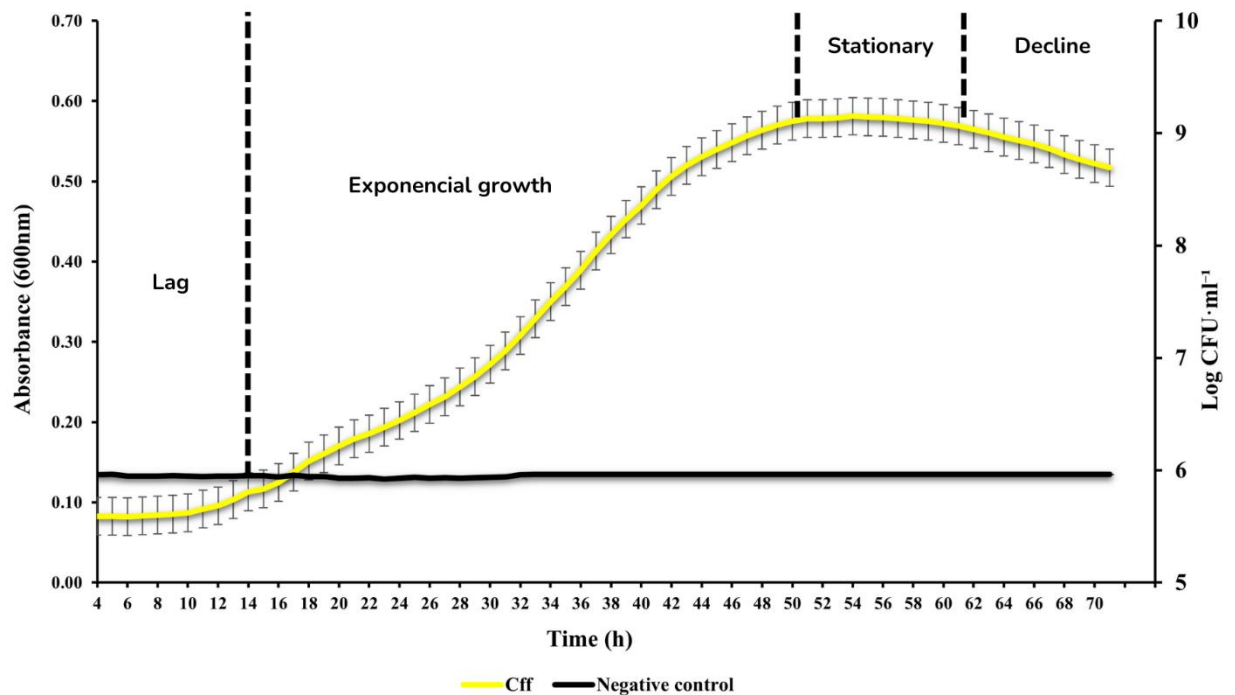
### **Growth Curve of *Cff***

The growth dynamics of *Cff* were characterized over a 72h period by monitoring optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) and viable cell counts (log CFU mL<sup>-1</sup>) (Figure 4). To our knowledge, this represents the first detailed description of a growth curve for this phytopathogen under *in vitro* conditions.

*Cff* exhibited the four classical phases of bacterial growth. An initial lag phase was observed during the first 14 h, with minimal variation in OD<sub>600</sub> values, indicating cellular adaptation to the culture conditions. The exponential growth phase started at approximately 14 h, when the OD<sub>600</sub> reached 0.128 and continued increasing until 51 h. During this period, a steady increase in both OD<sub>600</sub> and viable cell counts was observed, reaching a maximum OD<sub>600</sub> of 0.5826, consistent with active cell division.

The specific growth rate ( $\mu$ ) during the exponential phase was estimated at approximately 0.103 h<sup>-1</sup>, corresponding to a mean generation time of 6.8 h. Following exponential growth, the culture entered a stationary phase between 51 and 60 h, characterized by stabilization of OD<sub>600</sub> and CFU values, suggesting a balance between cell division and cell death. After 60 h, a gradual decline phase was detected, with a slight reduction in optical density and viable counts, indicative of nutrient depletion and accumulation of inhibitory metabolic by-products.

No significant changes were observed in the negative control throughout the experiment, confirming the specificity and reliability of the measurements. Together, these results provide a baseline growth profile for *Cff* and establish reference parameters for future physiological, pathogenicity, and antimicrobial studies involving this bacterium.

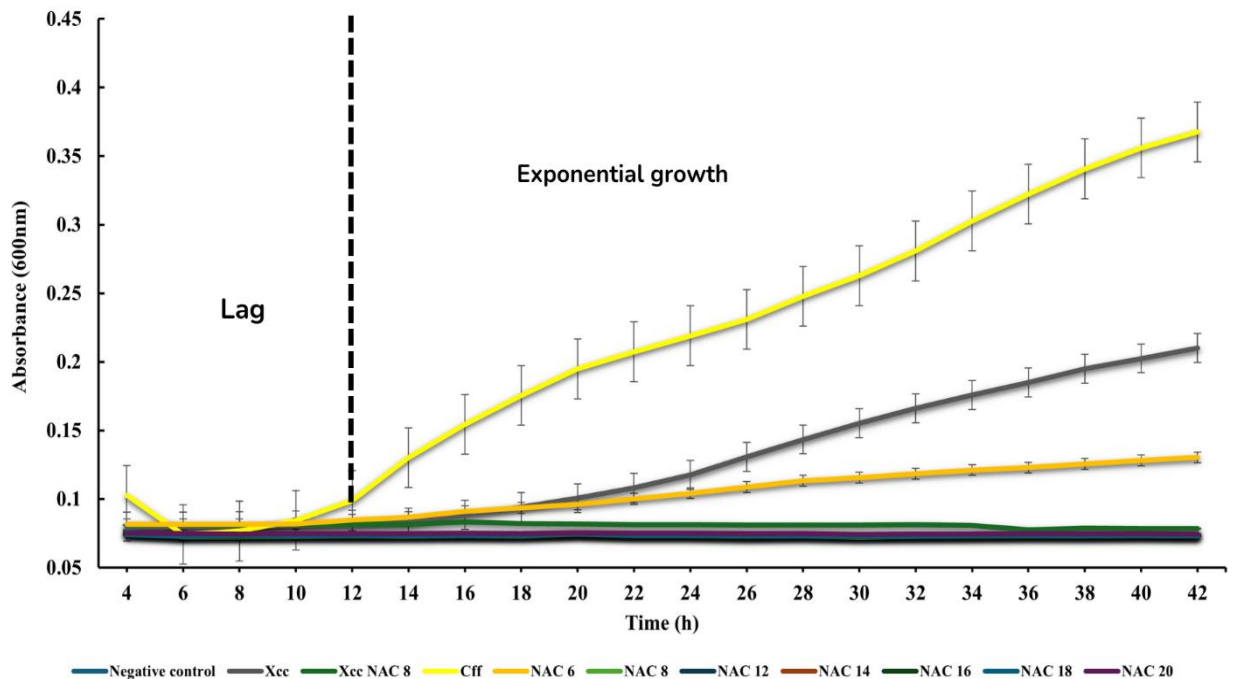


**Figure 5.** Growth curve of *Cff* cultivated in NBY medium over 72 h. Optical density (OD<sub>600</sub>, left axis) and viable cell counts (log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>, right axis) were monitored at 1-h intervals. Data represent mean ± SD (n = 3).

### Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of N-acetylcysteine (NAC)

The inhibitory effect of NAC on *Cff* growth was evaluated by monitoring OD<sub>600</sub> over time under increasing NAC concentrations (Figure 5). In the absence of NAC, *Cff* displayed a typical growth pattern, entering the exponential phase after the lag period. In contrast, NAC treatment resulted in a clear, concentration-dependent reduction in bacterial growth.

Partial growth inhibition was observed at 6 mg mL<sup>-1</sup>, as indicated by a marked reduction in OD<sub>600</sub> values compared with the positive control, although bacterial growth was not completely suppressed. At 8 mg mL<sup>-1</sup>, *Cff* growth was fully inhibited, with OD<sub>600</sub> values remaining stable throughout the experimental period and with no statistically significant differences compared to higher NAC concentrations (12–20 mg mL<sup>-1</sup>). These data define 8 mg mL<sup>-1</sup> as the minimum inhibitory concentration (MIC) of NAC, corresponding to the lowest concentration capable of completely preventing bacterial multiplication under the conditions tested (Figure 5).



**Figure 6.** Effect of NAC on *Cff* and *X. citri* subsp. *citri* growth. Bacterial cultures were incubated for 42 h in the absence or presence of 6, 8, 12, 14, 16, 18, and 20 mg mL<sup>-1</sup> NAC. Optical density (OD<sub>600</sub>) was monitored over time. Data represent mean ± SD from three independent experiments.

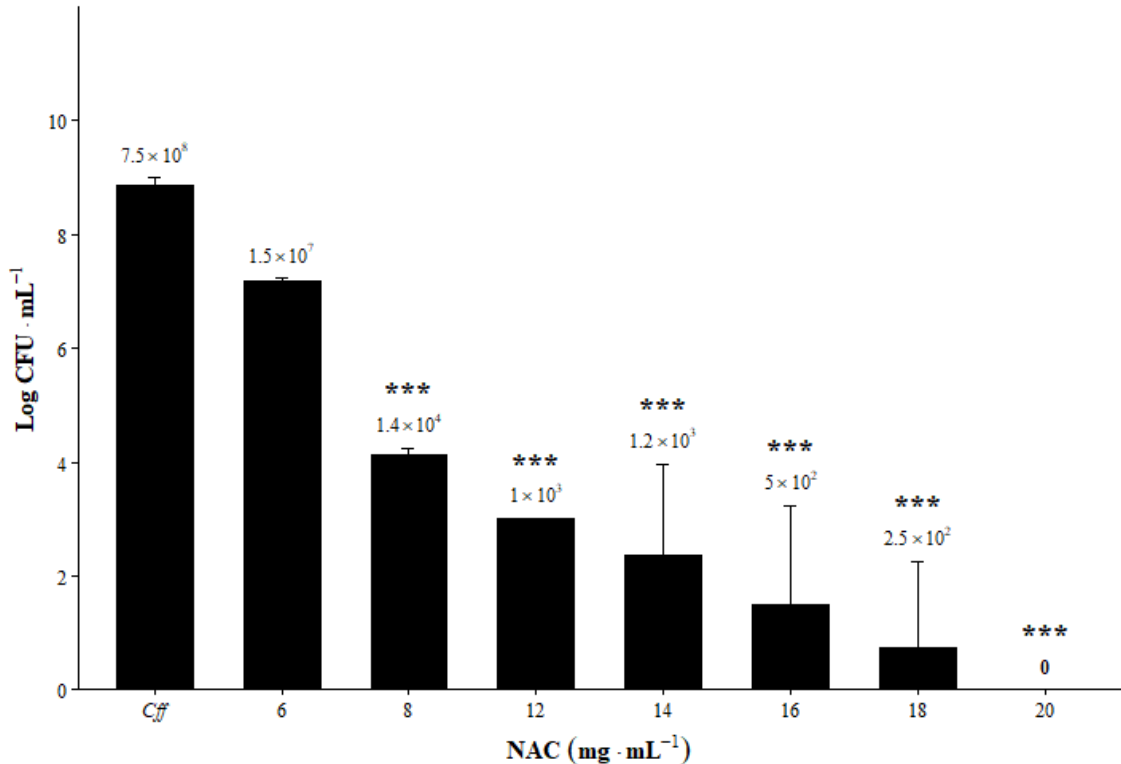
The *X. citri* subsp. *citri* strain was included as reference control and evaluated both in the absence and in the presence of 8 mg mL<sup>-1</sup> NAC (Figure 5). *X. citri* subsp. *citri* growth was effectively suppressed at this concentration, consistent with previous reports (Picchi et al., 2016), thereby confirming the antimicrobial activity of NAC and validating the experimental conditions employed in this study.

### Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of NAC

The bactericidal activity of NAC against *Cff* was evaluated by quantifying viable cells recovered after exposure to increasing NAC concentrations (Figure 6). The plating assay revealed a clear and statistically significant dose-dependent reduction in *Cff* survivability.

In the absence of NAC, *Cff* reached high cell densities, whereas treatment with 6 mg mL<sup>-1</sup> resulted in a moderate reduction in viable counts (Figure 6). A pronounced bactericidal effect was observed at 8 mg mL<sup>-1</sup>, with bacterial counts decreasing to  $1.4 \times 10^4$  CFU mL<sup>-1</sup> (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ), indicating a substantial reduction relative to the untreated control. Further increases in NAC concentration led to a sharp decline in recovered colonies:  $1.0 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> at 12 mg mL<sup>-1</sup> and  $1.2 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup> at 14 mg mL<sup>-1</sup>, corresponding to reductions above 98%.

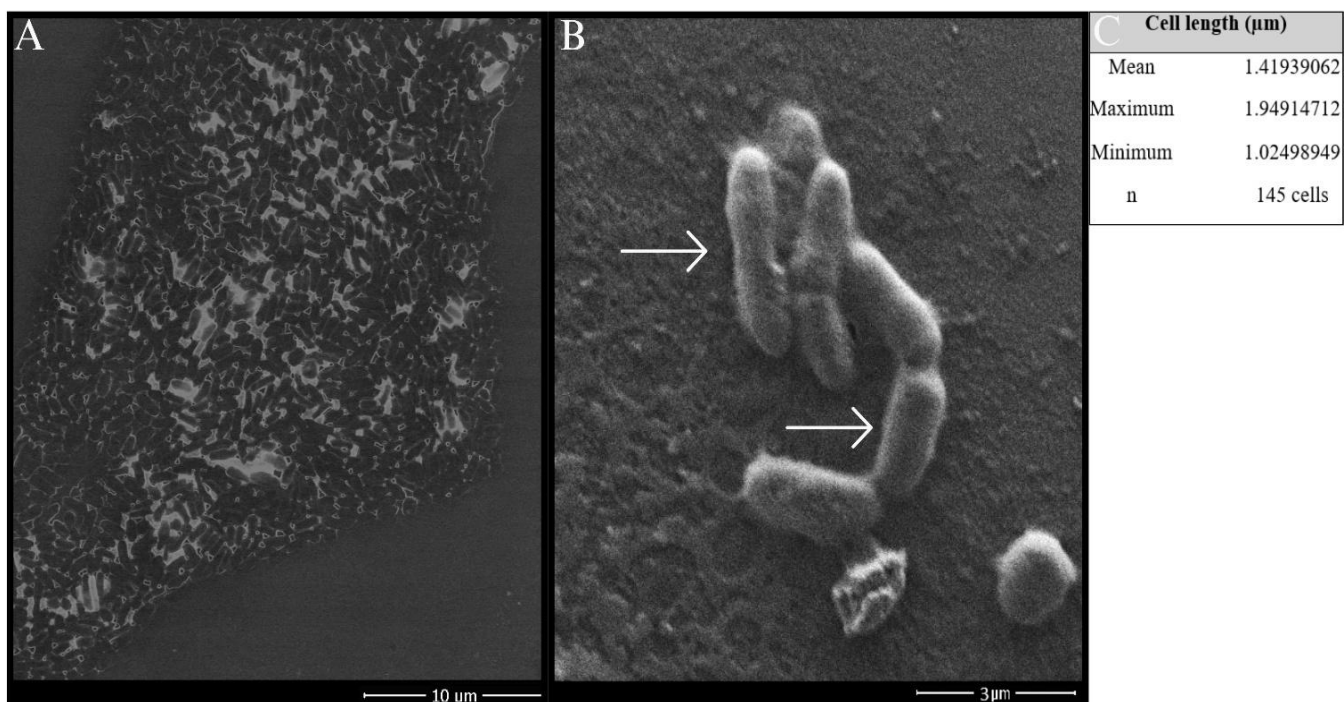
At higher concentrations, the bactericidal effect was increased. Treatments with 16 and 18 mg mL<sup>-1</sup> reduced viable counts to  $5 \times 10^2$  and  $2.5 \times 10^2$  CFU mL<sup>-1</sup>, respectively, representing reductions exceeding 99.5%. Complete suppression of bacterial growth was achieved only at 20 mg mL<sup>-1</sup>, with no detectable colonies recovered. This concentration was therefore defined as the minimum bactericidal concentration (MBC) of NAC under the experimental conditions evaluated.



**Figure 7.** Effect of NAC on *Cff* viability. Bacterial survival is expressed as Log<sub>10</sub>CFU mL<sup>-1</sup>. Bars represent mean ± SD (n = 4). Numerical values above the bars indicate absolute mean CFU mL<sup>-1</sup>. Asterisks (\*\*\*) indicate significant differences compared to the untreated control (p < 0.001; ANOVA followed by Tukey's test).

### ***Cff* Biofilm Formation and Effect of NAC**

Scanning electron microscopy revealed time-dependent biofilm development by *Cff* under control conditions. After 24 h of incubation, small biofilm clusters embedded in a matrix were also observed, in which differences in surface texture and contrast in the SEM images indicate the presence of extracellular polymeric substances (EPS) (Figure 7A). In addition, individual cells displayed the characteristic rod-shaped morphology, with a mean cell length of  $1.42 \pm \mu\text{m}$  (SE) (Figure 7B, C).

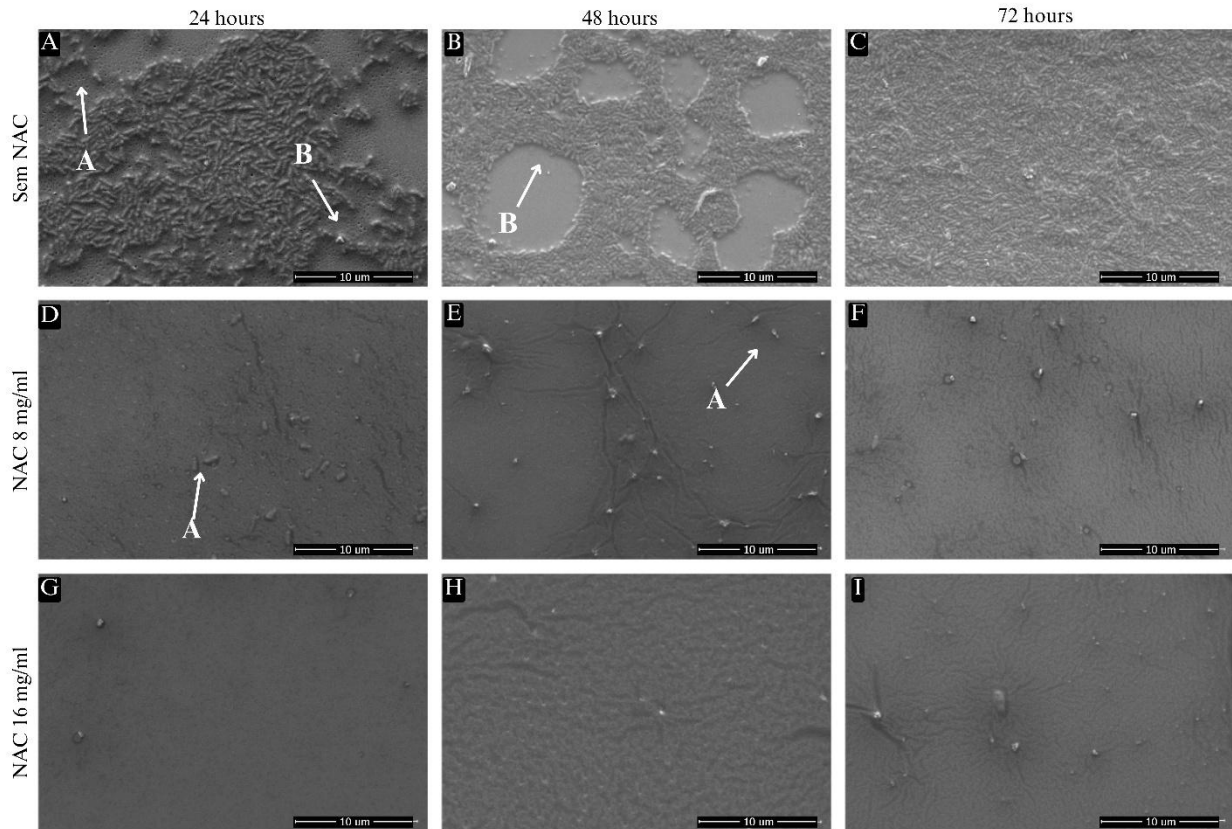


**Figure 7.** Scanning electron micrographs (SEM) of *Cff* grown on a glass coverslip surface after 24 h of incubation. (A) Biofilm formation characterized by aggregated layers of bacterial cells. This image was used for morphometric analysis of cell length. (B) Higher magnification showing individual rod-shaped *Cff* cells (arrows). (C) Summary of morphometric analysis of cell length based on measurements of 145 individual cells obtained from SEM images using ImageJ software. The mean cell length was 1.42 μm, with values ranging from 1.02 to 1.95 μm. Scale bars: 10 μm (A) and 3 μm (B).

At early stages, biofilm formation was evident, characterized by initial bacterial aggregates adhered to the surface (Figure 8A). These structures correspond to a flat, two-dimensional biofilm architecture, with cells predominantly organized in a monolayer and lacking complex three-dimensional structures. The presence of intercellular spaces resembling channel-like features suggests that the biofilm had not yet reached full maturation at this stage (Figure 8A). At 48 h, the biofilm exhibited increased structural organization, with expanded continuous areas and regions of higher cell density, indicative of biofilm progression (Figure 8B). By 72 h, a well-developed and compact biofilm was observed (Figure 8C), consistent with a mature biofilm architecture described for surface-associated bacterial communities (Janissen et al., 2015).

In contrast, biofilm formation was markedly inhibited in cultures supplemented with NAC. At 8 mg mL<sup>-1</sup>, only sparse, individual adherent cells were detected at 24 and 48 h (Figure 8D, E; arrow A), with no detectable cells remaining after 72 h (Figure 8F). At 16 mg mL<sup>-1</sup>, biofilm formation was completely suppressed at all evaluated time points, with no adherent cells or biofilm structures observed (Figure 8G–I). Collectively, these results demonstrate that

NAC effectively prevents biofilm establishment and development by *Cff* in a concentration-dependent manner.



**Figure 8.** Scanning electron micrographs (SEM) of *Cff* biofilms formed on glass coverslips in the absence or presence of NAC. (A-C) Biofilms formed without NAC after 24, 48, and 72 h, respectively. (D-F) Cultures supplemented with 8 mg mL<sup>-1</sup> NAC after 24, 48, and 72 h. (G-I) Cultures supplemented with 16 mg mL<sup>-1</sup> NAC after 24, 48, and 72 h. Arrow A indicates adherent bacterial cells, and arrow B indicates channel-like structures within the biofilm. Scale bar: 10 µm.

#### 4. DISCUSSION

*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) is the causal agent of common bean bacterial wilt and is considered one of the most severe diseases affecting this crop. Recently, it has been classified as an emerging disease, with its incidence favored and severity intensified under conditions of high temperatures and water deficit (Osdaghi et al., 2020). Despite its importance, there is a lack of basic studies addressing fundamental aspects of *Cff* biology, such as bacterial growth phases and generation time, which are essential for enabling standardized, reproducible, and well-controlled experimental studies with this pathogen. In this study, such foundational knowledge was established to support downstream investigations, including studies evaluating the effects of antimicrobial compounds on *Cff* growth and biofilm formation.

Initially, the molecular characterization of the bacterial strain IBSBF 2869 was confirmed through amplification of the 16S rRNA gene. The PCR reaction resulted in the amplification of two distinct fragments: one amplicon of approximately 1500 bp, corresponding to the expected size of the 16S rRNA gene, and a smaller fragment of approximately 300 bp. Sequencing confirmed that both fragments originate from the 16S rRNA gene. BLASTn analysis against the NCBI GenBank database revealed high sequence similarity to *Cff* reference sequences (Figure 3). This finding suggests the presence of multiple ribosomal RNA operons within the *Curtobacterium* genome. Genome analyses have reported that *Curtobacterium* species typically harbor three to four rRNA operons, including multiple copies of the 16S rRNA gene (O’Leary & Gilbertson, 2020; Evseev et al., 2022). The presence of multiple rRNA operons may contribute to sequence heterogeneity among 16S rRNA gene copies within a single genome (Evseev et al., 2022). Additionally, bacterial cell size was measured for the first time, revealing an average length of  $1.42 \pm \mu\text{m}$  (SE) (Figure 8C), which is consistent with the morphological characteristics previously reported for this pathogen (Soares, 2017).

The growth curve of *Cff* exhibited the four classical phases of bacterial development, indicating a well-defined physiological behavior under *in vitro* conditions. The lag phase suggests a substantial period of bacterial adaptation to the culture medium. The logarithmic phase, observed between 14 and 51 h, was characterized by active and constant growth, reflecting high metabolic activity. The specific growth rate ( $\mu = 0.103 \text{ h}^{-1}$ ) and the mean generation time of 6.8 h indicate that *Cff* exhibits moderate growth, consistent with values previously reported for other species of the genus *Curtobacterium* (Vasquez et al., 2024). This growth pattern may be partially associated with the structural complexity of the Gram-positive bacterial cell wall, characterized by a thick peptidoglycan layer, whose synthesis and remodeling require high energetic investment, thereby influencing growth and cell division dynamics (Rohde, 2019).

The transition to the stationary phase after 50 h suggests nutrient limitation and metabolite accumulation, conditions that frequently induce physiological changes. The decline phase observed after 60 h likely reflects reduced cell viability due to nutrient depletion and accumulation of toxic metabolic by products (Vasquez et al., 2024). The characterization of the *Cff* growth curve provides the physiological basis necessary for evaluating the antimicrobial activity of NAC. In this context, determination of the MIC and MBC allows a more comprehensive understanding of the effects of NAC on bacterial growth and viability.

Conceptually, MIC corresponds to the lowest concentration of a compound capable of visibly inhibiting bacterial growth, without necessarily resulting in cell death. In contrast, MBC is defined as the lowest concentration capable of eliminating bacterial viability, confirmed by the absence of growth after subculturing in an antimicrobial-free medium (Rodríguez-Melcón *et al.*, 2022). The distinction between these two parameters is essential for the correct interpretation of the mode of action of an antimicrobial agent, allowing differentiation between predominantly bacteriostatic and bactericidal effects.

In the present study, NAC inhibited *Cff* growth starting at a concentration of 8 mg mL<sup>-1</sup>, which was established as the MIC. Colony forming unit assays demonstrated that, although this concentration prevented the exponential growth observed in the control (which reached 10<sup>8</sup> CFU mL<sup>-1</sup>), it resulted in an 87.14% reduction relative to the initial inoculum (10<sup>5</sup> CFU mL<sup>-1</sup>), indicating the persistence of viable cells and characterizing a predominantly bacteriostatic effect. At intermediate concentrations, between 12 mg mL<sup>-1</sup> and 18 mg mL<sup>-1</sup>, bacterial counts underwent a progressive decline, maintaining reduction rates exceeding 98% relative to the initial population. These results evidence a strong inhibitory pressure that evolves into a partial bactericidal effect at higher concentrations, suggesting that increasing NAC levels may promote progressive metabolic disruption. NAC exposure may induce metabolic and redox imbalance, contributing to growth inhibition (Picchi *et al.*, 2021). Complete elimination of bacterial viability (100% death) was observed only at 20 mg mL<sup>-1</sup>, a concentration therefore defined as the MBC of NAC for *Cff* under the tested conditions.

When compared with previously reported data, the MIC of 8 mg mL<sup>-1</sup> falls within a range similar to described for Gram-negative phytopathogens such as *X. citri* subsp. *citri* and *X. fastidiosa*, for which concentrations between 6 and 8 mg mL<sup>-1</sup> are associated with growth inhibition (Muranaka *et al.*, 2013; Picchi *et al.*, 2016). In contrast, the MBC value required for total eradication (20 mg mL<sup>-1</sup>) aligns with the typical robustness of Gram-positive bacteria, resembling values of 20–25 mg mL<sup>-1</sup> reported for *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 and ATCC 33591), *Corynebacterium ammoniagenes* (IEGM 1862) (Eroshenko *et al.*, 2017), and high inhibitory concentrations of NAC have also been observed for biofilm-forming *Staphylococcus* strains (Petkova *et al.*, 2023). This similarity in effective concentrations highlights the relative tolerance of Gram-positive bacteria to NAC and supports its antimicrobial potential against *Cff*.

The results of biofilm formation demonstrate the ability of *Cff* to adhere to abiotic surfaces and form structured biofilms. The observation of isolated cells and bacterial aggregates

in the early stages, followed by increased organization and cell density over time, characterizes a typical biofilm development process, involving initial adhesion, microcolony formation, maturation, and establishment of a three-dimensional structure (Janissen *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2024).

The temporal progression observed, with initial biofilms at 24 h, greater organization at 48 h, and compact structures at 72 h, indicates that *Cff* undergoes a gradual and well-defined biofilm maturation process (Janissen *et al.*, 2015; da Silva *et al.*, 2024).

The addition of NAC exerted a marked effect on biofilm formation by *Cff*. In the presence of 8 mg mL<sup>-1</sup> NAC, inhibition of bacterial aggregate formation was observed, with only individual cells detected at early stage of biofilm formation development, and a complete absence of adherent cells was observed after 72 h of incubation. At higher concentrations (16 mg mL<sup>-1</sup>), NAC completely prevented cell adhesion and biofilm development at all evaluated time points, demonstrating its high efficacy as an antibiofilm agent.

The antibiofilm effect of NAC may be associated with its ability to interfere with cell adhesion and the stability of the extracellular biofilm matrix (dos Santos *et al.*, 2025). NAC, similar to other organosulfur compounds, possesses a thiol (-SH) group that underlies its broad range of well-established biological activities (Aldini *et al.*, 2018). In bacterial biofilms, NAC can disrupt disulfide bonds within cross-linked proteins, decreasing the integrity of EPS and reinforcing its antimicrobial activity (da Silva *et al.*, 2024).

The combined analysis of MIC, MBC, and biofilm disruption reveals an antimicrobial effect of NAC on *Cff*. This dissociation between bactericidal and antibiofilm effects highlights the potential of NAC as a control agent, since biofilm formation represents an important mechanism associated with *Cff* pathogenicity (Osdaghi *et al.*, 2020).

This study provides an *in vitro* characterization of the bacterial growth and biofilm-formation of *Cff*, along with the first evaluation of the antimicrobial and antibiofilm activity of NAC against a Gram-positive phytopathogenic bacterium. Together, these findings expand the current understanding of *Cff* biology and support further investigation of NAC as a candidate molecule for the control of *Cff*.

## 5. REFERENCES

- Aldini G, Altomare A, Baron G, Vistoli G, Carini M, Borsani L, Sergio F (2018) N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research* 52, 751–762. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1468564>
- Eroshenko D, Polyudova T, Korobov V (2017) N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. *Microbial Pathogenesis* 105, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.030>
- Evseev P, Lukianova A, Tarakanov R, Ignatov A, Miroschnikov K, Shneider M (2022) *Curtobacterium* spp. and *Curtobacterium flaccumfaciens*: phylogeny, genomics-based taxonomy, pathogenicity, and diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology* 44, 889–927. <https://doi.org/10.3390/cimb44020060>
- Ferreira AL, Wander AE, Pinheiro PV (2025) IPM adoption in common beans in Brazil. *Horticulturae* 11, 611. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11060611>
- Ferreira SR, Wendland A, Pereira RJ, Melo JA da S (2025) Cross-inoculation and host responses to *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in common bean, soybean, and cowpea: pathogenicity, symptom expression, and xylem colonization. *European Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8231906/v1>
- Harding MW, Marques LLR, Allan N, Chen S, McKellar RC (2022) Bactericidal efficacy of oxidized silver against biofilms formed by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *The Plant Pathology Journal* 38, 334–344. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2022.0055>
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA (2018) Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 81, 7–11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Janissen R, Murillo DM, Niza B, et al. (2015) Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports* 5, 9856. <https://doi.org/10.1038/srep09856>
- Kizheva Y, Pandova M, Dimitrova M, et al. (2024) First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* in Bulgaria. *Pathogens* 13, 483. <https://doi.org/10.3390/pathogens13060483>
- Muranaka LS, Giorgiano TE, Takita MA, Cordeiro AM, Souza AA, Machado MA (2013) N-Acetylcysteine in agriculture, a novel use for an old molecule: focus on controlling the plant-pathogen *Xylella fastidiosa*. *PLoS ONE* 8, e72937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072937>
- Nascimento DM, Oliveira LR, Melo LL, et al. (2021) Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the phyllosphere and rhizosphere of crops. *European Journal of Plant Pathology* 160, 161–172. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02232-9>
- O’Leary ML, Gilbertson RL (2020) Complete genome sequence resource of a strain of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* from Turkey. *Phytopathology* 110, 2010–2013. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0136-A>
- Osdaghi E, Young AJ, Harveson RM (2020) Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: a new threat from an old enemy. *Molecular Plant Pathology* 21, 605–621. <https://doi.org/10.1111/mpp.12926>
- Petkova T, Rusenova N, Danova S, Milanova A (2023) Effect of N-acetyl-L-cysteine on activity of doxycycline against biofilm-forming bacterial strains. *Antibiotics* 12, 1187. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071187>
- Picchi SC, Rebelatto D, Martins PMM, et al. (2024) N-acetylcysteine absorption and its potential dual effect improve fitness and fruit yield in *Xylella fastidiosa* infected plants. *Pest Management Science* 80, 4333–4343. <https://doi.org/10.1002/ps.8137>
- Picchi SC, de Souza e Silva M, Saldanha LL, et al. (2021) GC-TOF/MS-based metabolomics analysis to investigate changes driven by N-acetylcysteine in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Scientific Reports* 11, 22142. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95113-4>
- Picchi SC, Takita MA, Coletta-Filho HD, Machado MA, de Souza AA (2016) N-acetylcysteine interferes with biofilm formation, motility and epiphytic behaviour of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Pathology* 65, 561–569. <https://doi.org/10.1111/ppa.12430>
- Puia JD, Ferreira MGD Ben, Hoshino AT, Borsato LC, Canteri MG, Vigo SC (2021) Occurrence of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the state of Paraná and its pathogenicity in beans. *European Journal of Plant Pathology* 159, 627–636. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02193-5>
- Qiao K, Liu Q, Xia Y, Zhang S (2021) Evaluation of N-acetylcysteine for the management of bacterial spot of tomato. *Plant Disease* 105, 108–113. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-0928-RE>
- Rodríguez-Melcón C, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Carballo J, Capita R (2022) Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials in *Listeria monocytogenes*. *Biology* 11, 46. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>

- Rohde M (2019) The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology Spectrum* 7. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>
- dos Santos LN, do N Cavalcante L, Rocha DC, Prado GS, Coletta-Filho HD, de Souza AA (2025) N-Acetylcysteine in agriculture: new insights into its effects for sustainable crop management. *PhytoFrontiers* 5, 5–16. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-10-24-0115-RVW>
- Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, et al. (2022) The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology* 20, 608–620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- da Silva AM, Murillo DM, Anbumani S, et al. (2024) N-acetylcysteine effects on extracellular polymeric substances of *Xylella fastidiosa*: A spatiotemporal investigation with implications for biofilm disruption. *International Journal of Antimicrobial Agents* 64, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2024.107340>
- Soares, R.M. (2017) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soybean crop. Documents 389. Londrina, PR: Embrapa Soja, 30 pp. ISSN 2176-2937.
- Tarakanov R, Ignatov A, Evseev P, et al. (2023) Development of a multiplex real-time PCR method for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soybean seeds. *Brazilian Journal of Biology* 83, e267576. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.275505>
- Thomas P, Sekhar AC, Upreti R, Mujawar MM, Pasha SS (2015) Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. *Biotechnology Reports* 8, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>
- Tokmakova AD, Tarakanov RI, Lukianova AA, et al. (2024) Phytopathogenic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains circulating on leguminous plants, alternative hosts and weeds in Russia. *Plants* 13, 667. <https://doi.org/10.3390/plants13050667>
- Valdo SCD, Wendland A, Gonçalves LA, Silva CS, Araújo LG (2022) Evidence of post-formed structures during systemic *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* infection in resistant *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Colloquium Agrariae* 18, 12–20. <https://doi.org/10.5747/ca.2022.v18.n4.a503>
- Vasquez YMSC, Cueva-Yesquen LG, Duarte AWF, et al. (2024) Genomics, proteomics and antifungal activity of chitinase from *Curtobacterium* sp. CBMAI 2942. *International Journal of Molecular Sciences* 25, 9250. <https://doi.org/10.3390/ijms25179250>

## Capítulo 2 - Avaliação do *N*-acetilcisteína no manejo da murcha bacteriana do feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

### 1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) representa uma das principais culturas alimentares no Brasil e no mundo, desempenhando papel fundamental na segurança alimentar e na geração de renda em diferentes sistemas de produção (A. Ferreira et al., 2025). Entretanto, sua produtividade é frequentemente limitada por doenças bacterianas, dentre as quais se destaca a murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*). Considerada uma doença emergente, a murcha bacteriana tem sido associada a surtos severos e expansão geográfica recente, favorecida por sementes infectadas e condições ambientais quentes (Osdaghi et al., 2020; Tokmakova et al., 2024).

A patogenicidade de *Cff* está diretamente relacionada à sua capacidade de colonizar o sistema vascular do hospedeiro. Após a infecção, a bactéria se estabelece nos vasos do xilema, onde forma agregados celulares e estruturas organizadas compatíveis com biofilmes, contribuindo para a obstrução do fluxo hídrico e consequente desenvolvimento dos sintomas de murcha (Osdaghi et al., 2020; Valdo et al., 2022). A formação de biofilme no ambiente vascular representa um importante fator de virulência, pois confere proteção às células bacterianas, favorece persistência e dificulta estratégias de controle químico (Sauer et al., 2022).

Além da obstrução física causada pelo biofilme, a infecção por *Cff* desencadeia respostas fisiológicas na planta associadas ao estresse oxidativo. O reconhecimento do patógeno leva à rápida produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), fenômeno conhecido como “explosão oxidativa” (Rao et al., 2025). Em níveis controlados, essas moléculas atuam como sinalizadores na ativação de mecanismos de defesa. Contudo, o acúmulo excessivo de EROs promove danos a lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, caracterizando o estresse oxidativo (Cannea & Padiglia, 2025).

Para manter a homeostase redox, as plantas ativam sistemas antioxidantes enzimáticos, incluindo superóxido dismutase (SOD), responsável pela conversão de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ ; catalase (CAT), que decompõe  $H_2O_2$  em água e oxigênio; e ascorbato peroxidase (APX), que integra o ciclo ascorbato–glutaciona e regula finamente os níveis de  $H_2O_2$  intracelular (Rao et al., 2025).

Alterações na atividade dessas enzimas têm sido associadas à progressão de doenças vasculares e à intensidade da colonização bacteriana (Sood, 2025).

Nesse contexto, estratégias de manejo que atuem simultaneamente sobre o patógeno e sobre o estado redox da planta podem representar abordagem promissora. O N-acetilcisteína (NAC), uma molécula contendo grupo tiol (-SH), é reconhecido por sua capacidade antioxidante e por atuar como agente redutor de pontes dissulfeto, interferindo na estabilidade de matrizes extracelulares bacterianas (Aldini et al., 2018; da Silva et al., 2024). No Capítulo 1 desta dissertação, demonstrou-se que o NAC inibe o crescimento de *Cff* (MIC = 8 mg mL<sup>-1</sup>; MBC = 20 mg mL<sup>-1</sup>) e impede a formação de biofilme *in vitro*, evidenciando potencial interferência direta nos mecanismos associados à virulência do patógeno.

Além de seu efeito antibacteriano, estudos em outros patossistemas vasculares indicaram que o NAC pode reduzir o estresse oxidativo em plantas infectadas, promovendo melhoria no estado fisiológico e na produtividade. Em citros infectados por *X. fastidiosa*, a aplicação de NAC reduziu a carga bacteriana e promoveu melhorias em parâmetros produtivos, sugerindo um efeito duplo de antibiofilme e antioxidante (Picchi et al., 2024). Em sistemas vegetais submetidos a estresse, o NAC também demonstrou modular a atividade de enzimas antioxidantes, contribuindo para a manutenção da homeostase redox (Sakamoto & Suzuki, 2024).

Considerando a similaridade no padrão de colonização vascular entre *Cff* e outros fitopatógenos formadores de biofilme como *X. fastidiosa*, levanta-se a hipótese de que o NAC possa interferir não apenas no controle da murcha bacteriana do feijoeiro, mas também na resposta oxidativa associada à infecção, refletindo em alterações na severidade da doença e na produtividade do feijoeiro.

Dessa forma, este capítulo teve como objetivo avaliar o efeito de produtos à base de NAC no controle da murcha bacteriana do feijoeiro em condições de casa de vegetação e campo. Foram conduzidos experimentos para padronização do método de inoculação, avaliação da severidade da doença por meio da área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC), análise de componentes de produtividade e quantificação da atividade de enzimas antioxidantes associadas ao estresse oxidativo em plantas infectadas.

## 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1 Comparar diferentes métodos de inoculação e concentração de *Cff* em plantas de feijoeiro, para a indução da murcha bacteriana em casa-de-vegetação.
- 2.2 Avaliar a severidade da murcha bacteriana ao longo do tempo e estimar a área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC) como parâmetro quantitativo da evolução dos sintomas.
- 2.3 Avaliar a formação de biofilme por *Cff* em tecidos de feijoeiro por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- 2.4 Determinar o efeito de produtos à base de NAC no controle da murcha bacteriana em plantas inoculadas com *Cff*, em condições de casa-de-vegetação e campo.
- 2.5 Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes (SOD e APX) em plantas inoculadas com *Cff* e tratadas com NAC, para determinar possíveis efeitos na redução estresse oxidativo em plantas infectadas com *Cff*.

## 3. MATERIAL E METODOS

### 3.1 Ensaios de patogenicidade e definição da concentração de inóculo

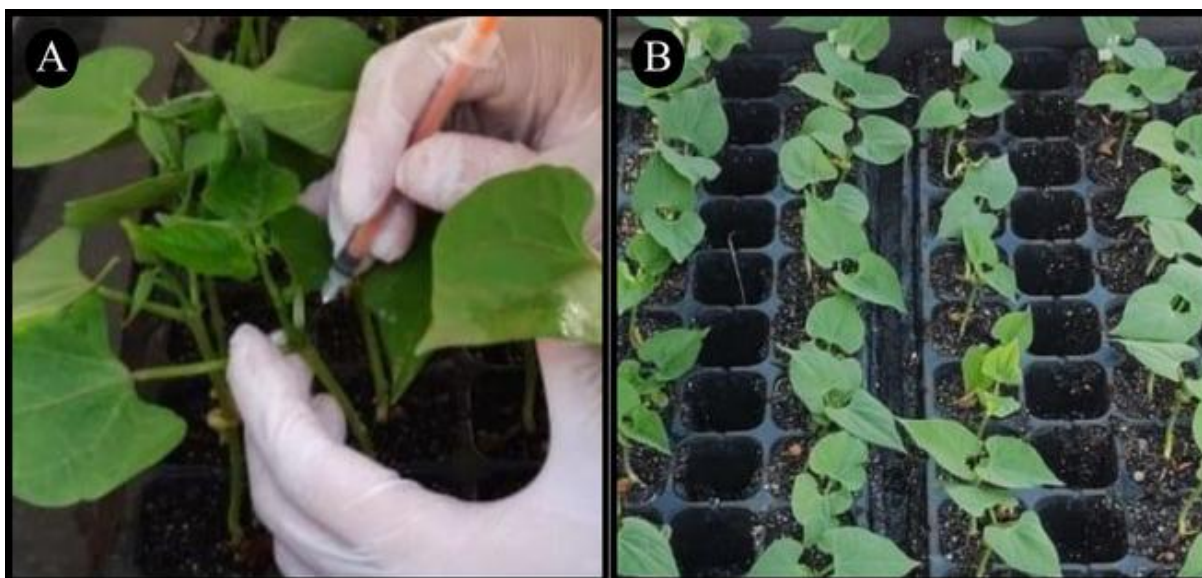
Os ensaios de patogenicidade foram conduzidos utilizando a cultivar de feijão carioca IAC. Inicialmente, realizou-se um experimento com o objetivo de confirmar a virulência da estirpe IBSBF 2869 de *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*), obtida da coleção de culturas do Instituto Biológico (SP) (<https://regiaocampinas.org.br/instituto-biologico/>), número de acesso 1337, e correlacionar a severidade dos sintomas da murcha bacteriana às diferentes concentrações de inóculo. Para isso, foram utilizadas plântulas com 7 dias após a germinação (DAG).

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de um pré-inóculo de *Cff* cultivado em 10 mL de meio líquido NBY, mantido sob agitação constante (180 rpm), a 28 °C, por um período de 16 a 18 horas. Após esse período, a densidade óptica (DO) da suspensão bacteriana foi determinada por espectrofotometria, obtendo-se uma DO<sub>600nm</sub> inicial de 1,25. A partir desse valor, foram realizadas diluições seriadas em meio NBY estéril, com plaqueamento em meio Nutriente Ágar (NA) para determinação da Unidade Formadora de Colônia (UFC). Após incubação (28°C, 48 h), as colônias foram contadas e a concentração foi calculada pela fórmula:

UFC/mL = (Número de colônias × Fator de diluição) / Volume plaqueado (0,01 mL) (Thomas et al., 2015). Confirmando as suspensões bacterianas nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL.

A inoculação das plântulas foi realizada conforme o protocolo descrito por (Puia et al., 2021). Para cada planta, aplicaram-se 10  $\mu$ L da suspensão bacteriana no caule, na região entre as folhas cotiledonares e as folhas primárias, seguido da realização de três perfurações com agulha estéril no local de aplicação (**Figura 1A**). As plantas pertencentes ao tratamento controle receberam apenas meio NBY estéril, seguido das perfurações. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em casa de vegetação (**Figura 1B**).

A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 7, 11 e 14 dias após a inoculação (DAI), por meio de uma escala visual de severidade proposta por (Krause et al., 2009), conforme descrito na Tabela 1.



**Figura 1.** Inoculação artificial de *Cff* em plântulas de feijoeiro (cultivar IAC 2051). (A) Inoculação realizada no caule das plântulas por meio da aplicação da suspensão bacteriana, seguida de perfurações com agulha estéril, na região entre as folhas cotiledonares e as folhas primárias. (B) Plântulas de feijão aos 7 DAG.

**Tabela 1.** Escala de notas utilizada para avaliação da severidade da murcha bacteriana causada por *Cff*.

Notas	Sintomas
1	Ausência de sintomas
2	Até 25% de amarelecimento ou necrose na área infectada
3	Entre 25% à 50% de amarelecimento ou necrose na área infectada
4	Entre 50% à 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada
5	Mais de 75% de amarelecimento ou necrose na área infectada

### 3.2 Avaliação de métodos de inoculação de *Cff* em plantas de feijoeiro

O delineamento experimental foi realizado com o objetivo de identificar o método de inoculação mais eficiente para o estabelecimento da doença e a expressão dos sintomas causados por *Cff* em plantas de feijoeiro. O ensaio foi composto por oito tratamentos, correspondentes a quatro métodos distintos de inoculação e seus respectivos controles sem *Cff*.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com oito repetições por tratamento. Cada unidade experimental foi constituída por um vaso com capacidade de 6 L, contendo três plantas. A suspensão bacteriana foi preparada conforme descrito anteriormente. Após o crescimento bacteriano, a DO da suspensão foi determinada por espectrofotometria e ajustada para atingir a concentração específica estabelecida para cada tratamento (**Tabela 2**).

Os métodos de inoculação, as concentrações de inóculo e os respectivos procedimentos adotados, bem como os tratamentos controle, estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2:** Descrição dos tratamentos utilizados na avaliação de métodos de inoculação de *Cff* em feijoeiro.

Tratamento	Concentração	Procedimento	Controle
Submersão (T1)	10 <sup>8</sup> UFC/mL	Sementes desinfestadas em solução de NaOCl a 0,5% por 2 min, lavadas em água destilada estéril, secas à temperatura ambiente, imersas por 20 min na suspensão bacteriana e, posteriormente, semeadas.	NBY (submersão)
Solo (T2)	10 <sup>8</sup> UFC/mL	Irrigação do solo com 10 mL da suspensão bacteriana no momento do plantio	NBY (irrigação)
Agulha (T3)	10 <sup>5</sup> UFC/mL	Plântulas germinadas por 48 h em papel Germitest, transplantadas para vasos e, aos 14 DAG, inoculadas por aplicação de 10 µl da suspensão no caule, seguida de três perfurações com agulha de insulina estéril.	NBY (perfuração)
Pulverização (T4)	10 <sup>5</sup> UFC/mL	Plântulas conduzidas conforme T3; aos 14 DAG, pulverização da suspensão bacteriana sobre a parte aérea, seguida de leves perfurações nas folhas com alfinetes	NBY (pulverização)

A avaliação da severidade da doença foi realizada aos 7, 14, 21 e 28 DAI, utilizando-se a escala visual de severidade (Tabela 1). A partir dos valores de severidade obtidos ao longo do tempo, foi estimada a área abaixo da curva de progresso da murcha (AUDPC), conforme metodologia descrita por Theodoro & Maringoni, (2006), utilizando a fórmula:  $AUDPC = \sum \{[(Y_1 + Y_2)/2] \times \Delta t\}$ , em que  $Y_1$  e  $Y_2$  correspondem aos valores de severidade em duas avaliações sucessivas dentro do mesmo bloco, e  $\Delta t$  ao intervalo de tempo entre essas avaliações.

Para a confirmação da infecção das plantas por *Cff*, foi realizada a confirmação molecular do patógeno por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os primers específicos CFF1F (5'-GTT ATG ACT GAA CTT CAC TCC-3') e CFF1R (5'-GGA TGT TCC CGG TGT TCA GT-3'), descritos por Tarakanov et al. (2023). A extração de DNA foi realizada a partir dos pecíolos e nervuras centrais das folhas das plantas inoculadas, empregando-se o kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit. A qualidade e a concentração do DNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoPhotometer N60 (Implen), e as amostras foram armazenadas a -20 °C até o momento das análises.

As reações de PCR foram preparadas em volume final de 25 µL, contendo 1,25 µL de cada primer (10 mM), 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 8,0 µL de água Milli-Q e 2 µL de DNA molde. A amplificação foi realizada em termociclador, com desnaturação inicial a 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 40 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s, finalizando com uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

Os valores de severidade ao longo do tempo e AUDPC foram submetidos à análise estatística de comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando o programa estatístico R (v. 2025.09.2). As plantas foram conduzidas até o final do ciclo de desenvolvimento, sendo as sementes colhidas e contadas ao término do experimento.

### **3.2.1 Interação patógeno–hospedeiro em feijoeiro: análise da colonização vascular de *Cff* por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

O ensaio experimental teve como objetivo a avaliação da colonização de *Cff* nos vasos do xilema de plantas de feijão comum, cultivar IAC 2051, por meio de análises em MEV. As plantas foram cultivadas em vasos com capacidade de 2 L, contendo três plantas por vaso, sendo o experimento conduzido com duas repetições.

Foram estabelecidos dois tratamentos experimentais: plantas inoculadas com *Cff* e plantas sem *Cff*, utilizadas como controle. A inoculação foi realizada sete dias após o plantio, utilizando-se o método de perfuração do caule, conforme descrito anteriormente no item 3.1, empregando-se o isolado IBSBF 2869.

Plantas que apresentaram sintomas característicos da murcha bacteriana foram coletadas 14 dias após a inoculação. Para a análise microscópica, amostras do caule foram seccionadas transversal e longitudinalmente, utilizando-se o método Cryofracture-SEM. Os fragmentos foram obtidos a aproximadamente 2 cm acima e 2 cm abaixo do ponto de inoculação e foram previamente congelados por imersão em nitrogênio líquido, para à observação da colonização bacteriana nos tecidos vasculares adjacentes.

As análises em microscopia eletrônica de varredura foram realizadas utilizando o microscópio Hitachi TM4000Plus, sendo obtidas imagens representativas da interação entre *Cff* e os tecidos vasculares do hospedeiro.

### **3.3 Avaliação das diferentes formas de aplicação do NAC nos sintomas da murcha bacteriana em condições de casa-de-vegetação**

Após a definição do método de inoculação mais eficiente, foi conduzida a etapa de avaliação do efeito do NAC no controle da murcha bacteriana em condições de casa de vegetação. Esta etapa foi composta por dois experimentos independentes.

O primeiro experimento foi conduzido em DIC, fatorial 2x4, sendo o fator 1: condição de inoculação (**Figura 2**) e o fator 2: NAC (diferentes tratamentos à base de NAC), conforme descrito na Tabela 3. Foram utilizadas oito repetições por tratamento, sendo cada repetição composta por quatro vasos de 6 L, contendo duas plantas por vaso.

A suspensão bacteriana de *Cff* foi preparada conforme descritos no item 3.1. A  $DO_{600nm}$  da suspensão foi ajustada para a concentração final de  $10^5$  UFC/mL. A inoculação das plantas foi realizada pelo método de “Agulha (T3)”, previamente selecionado, conforme descrito no item 3.2, tabela 2.

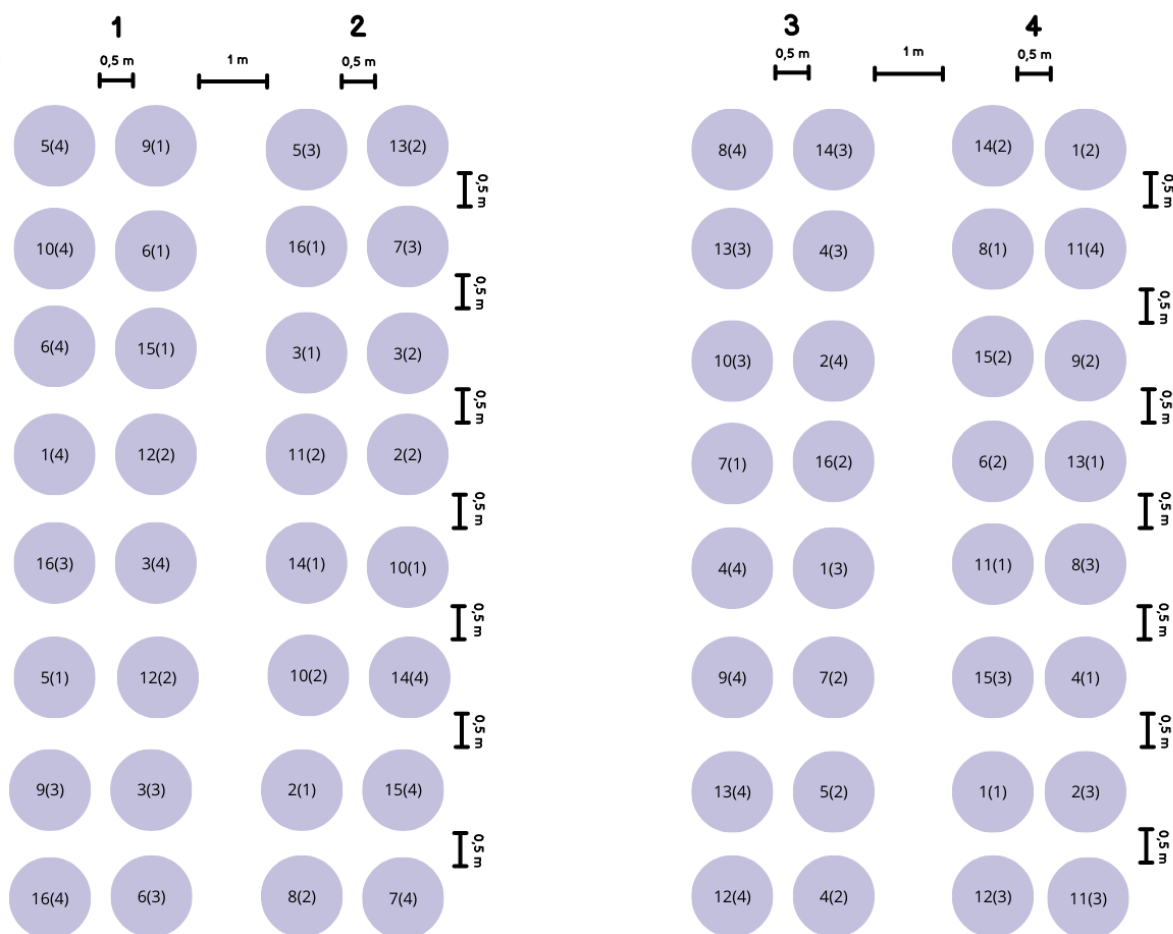
A aplicação do NAC foi realizada por meio dos produtos comerciais Cerealis e Cerealis TS (Amazon Agroscience), além do NACAgri, que consiste no NAC peletizado com um fertilizante orgânico de liberação lenta, além do controle sem NAC, totalizando 16 tratamentos (Figura 2). O produto Cerealis foi aplicado via foliar, em duas aplicações realizadas nos estádios fenológicos V4 e R5. Os produtos Cerealis TS e NACAgri foram aplicados via solo, no momento do plantio (**Tabela 3**).

A severidade da doença foi avaliada aos 7, 14, 21, 28 e 35 DAI, utilizando-se a escala de severidade (**Tabela 1**).

**A**

Tratamentos:

- (1) Cerealis TS (inoculado)
- (2) NacAgri (inoculado)
- (3) Cerealis (inoculado)
- (4) Cerealis TS + Cerealis (inoculado)
- (5) Cerealis TS + NACAgri (inoculado)
- (6) NAC Agri + Cerealis (inoculado)
- (7) Cerealis TS + NACAgri + Cerealis (inoculado)
- (8) Controle sem NAC (inoculado)
- (9) Cerealis TS (não inoculado)
- (10) NacAgri (não inoculado)
- (11) Cerealis (não inoculado)
- (12) Cerealis TS + Cerealis (não inoculado)
- (13) Cerealis TS + NACAgri (não inoculado)
- (14) NAC Agri + Cerealis (não inoculado)
- (15) Cerealis TS + NACAgri + Cerealis (não inoculado)
- (16) Controle sem NAC (não inoculado)

**B**

**Figura 2.** Esquema experimental em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado. (A) Tratamentos avaliados: (1–8) plantas inoculadas com *Cff* e (9–16) plantas não inoculadas com *Cff*, incluindo aplicações de Cerealis TS, NacAgri e Cerealis, isoladas ou em combinação, além do controle sem NAC. (B) Disposição das unidades experimentais (vasos) na casa de vegetação, distribuídas em quatro bancadas numeradas (1–4), com espaçamentos entre vasos e entre fileiras conforme indicado (0,5 m e 1,0 m). Em cada vaso, o número antes do parêntese indica o tratamento (1–16) e o número entre parênteses indica a repetição (1–4).

**Tabela 3:** Descrição das doses e formas de aplicação do NAC nos tratamentos do experimento conduzido em casa de vegetação.

Tratamento	Dose por planta	Procedimento
Cerealis TS	30µl em 50 mL	Aplicado no plantio
NACAgri	50 g	Aplicado no plantio

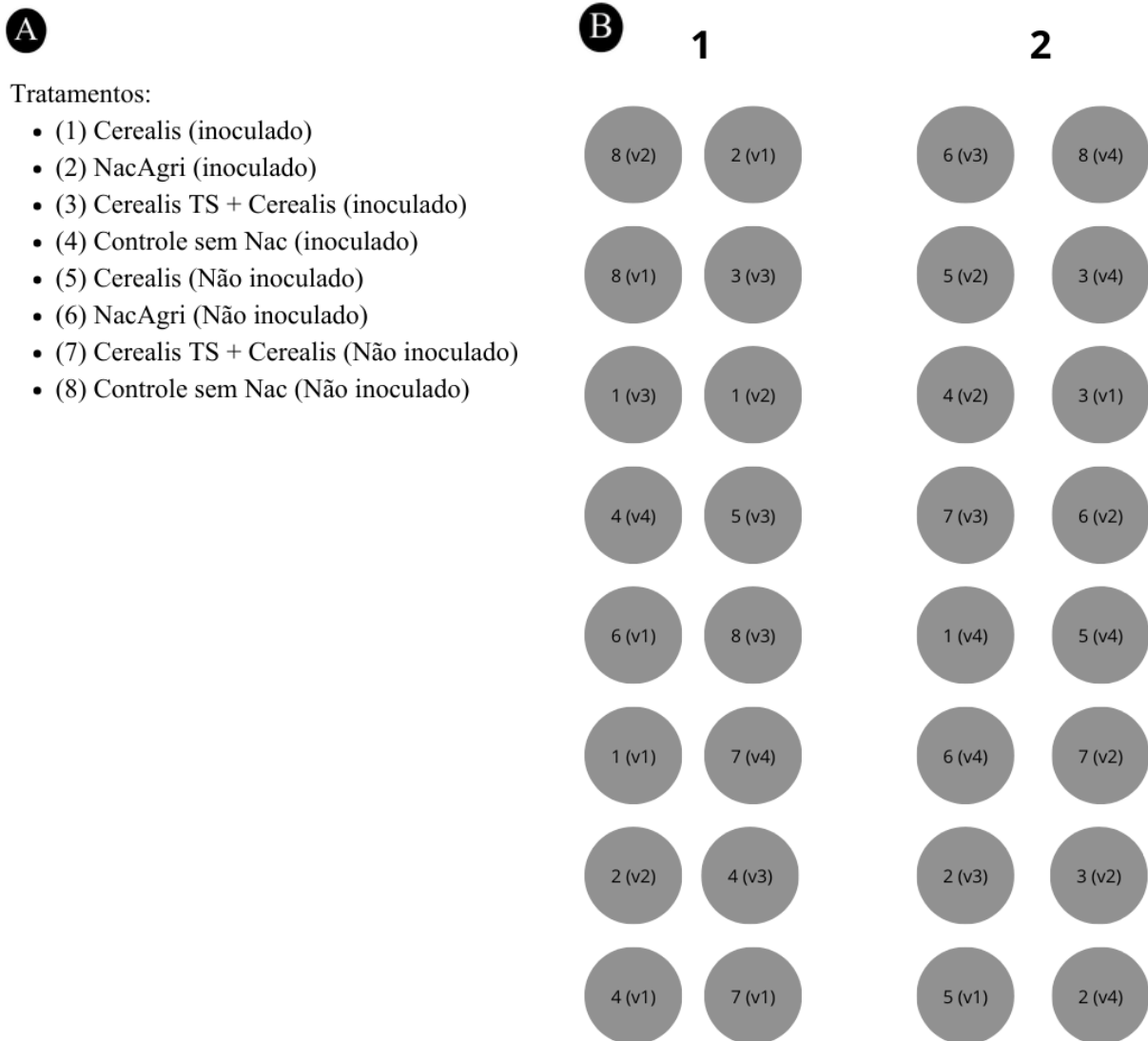
Cerealis	2 x 15 µl em 25 mL	Pulverizado nos estádios V4 e R5
Cerealis TS + Cerealis	15 µl de TS em 50 mL + 2 x 7,5 µl Cerealis em 25 mL	Aplicado no plantio + pulverizado nos estádios V4 e R5
Cerealis TS + NACAgrri	15 µl de TS em 50 mL + 25 g de NACAgrri	Aplicado no plantio
NACAgrri + Cerealis	25 mg de NACAgrri + 2 x 7,5 µl Cerealis em 25 mL	Aplicado no plantio + pulverizado nos estádios V4 e R5
Cerealis TS + NACAgrri + Cerealis	16,7 g NACAgrri + 10 µl de TS em 50 mL + 2 x 5 µl Cerealis em 25 mL	Aplicado no plantio + pulverizado nos estádios V4 e R5
Controle sem NAC	—	—

### 3.4 Avaliação das diferentes formas de aplicação do NAC nos parâmetros de produtividade

O segundo experimento foi conduzido com base nos resultados de severidade obtidos no primeiro ensaio, sendo selecionados quatro tratamentos inoculados com *Cff* e seus respectivos controles não inoculados (**Figura 3**), conforme descrito na Tabela 4. O número de plantas, vasos por tratamento, bem como a forma e a concentração de inoculação, foram mantidos conforme o experimento do item 3.3. A aplicação do NAC seguiu os mesmos procedimentos descritos na tabela 3, com a adição de uma terceira aplicação via foliar do produto Cerealis, realizada no estágio fenológico R6 (**Tabela 4**). As plantas foram mantidas até o final do ciclo de desenvolvimento, sendo as sementes colhidas, contadas e pesadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R.

**Tabela 4.** Descrição das doses e formas de aplicação do NAC nos tratamentos selecionados para o segundo experimento em casa de vegetação.

Tratamento	Dose por planta	Procedimento
Cerealis	3 x 30 µl em 15 mL	Pulverizado nos estádios V4, R5 e R6
NACAgrri	50 g	Aplicado no plantio
Cerealis TS + Cerealis	45 µl de TS em 50 mL + 3 x 15 µl Cerealis em 15 mL	Aplicado no plantio + pulverizado nos estádios V4, R5 e R6

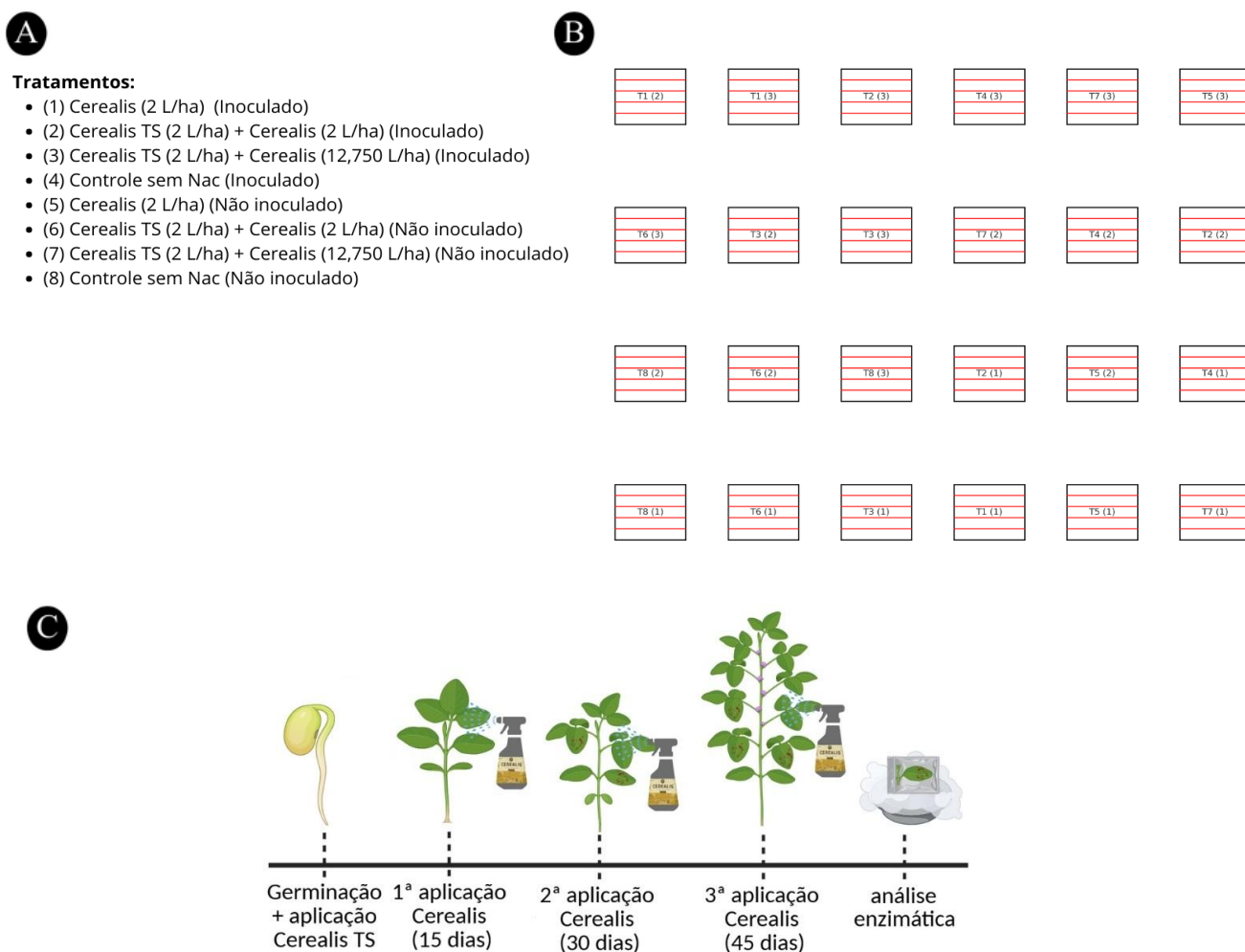


**Figura 3.** Esquema experimental em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado. (A) Tratamentos avaliados: (1) Cerealis (inoculado com *Cff*); (2) NacAgri (inoculado com *Cff*); (3) Cerealis TS + Cerealis (inoculado com *Cff*); (4) controle sem NAC (inoculado com *Cff*); (5-8) Tratamentos sem *Cff*, variando as mesmas aplicações de NAC. (B) Distribuição das unidades experimentais (vasos) em duas bancadas numeradas (1 e 2). Em cada vaso, o número antes do parêntese indica o tratamento (1–8) e o código entre parênteses indica a repetição (v1–v4).

### 3.5 Avaliação do NAC no controle da murcha bacteriana em condições de campo

Após a seleção dos tratamentos mais promissores nos ensaios conduzidos em casa de vegetação, foi realizado um experimento de campo com o objetivo de avaliar o desempenho do Cerealis TS e Cerealis no manejo da murcha bacteriana causada por *Cff*. O experimento foi composto por quatro tratamentos, sendo três com aplicação de NAC em diferentes doses e um controle sem NAC (**Figura 4A**), avaliados sob duas condições: com e sem *Cff*.

O experimento foi conduzido em DIC, fatorial 2x4 (**Figura 4B**). O fatorial 2x4 foi composto do Fator 1: Condição de inoculação (Inoculado e Não Inoculado) e o Fator 2: NAC (4 tratamentos: Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>); Controle sem NAC, totalizando 8 tratamentos com 3 repetições por tratamento (**Figura 4B**). Cada parcela experimental foi constituída por quatro linhas de 2 m de comprimento, com espaçamento de 0,20 m entre linhas, totalizando uma área de 1,6 m<sup>2</sup> por parcela.



**Figura 4.** Esquema experimental do ensaio de campo para avaliação de produtos à base de NAC no manejo da murcha bacteriana causada por *Cff*, considerando plantas com e sem *Cff*. (A) Tratamentos avaliados: (1) Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>) (inoculado); (2) Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>) (inoculado); (3) Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12.750 L ha<sup>-1</sup>) (inoculado); (4) controle sem NAC (inoculado); (5-8) Tratamentos não inoculados, variando as respectivas doses de NAC. (B) Arranjo das parcelas no campo, com distribuição aleatorizada dos tratamentos (1–8) nas unidades experimentais, conforme indicado no esquema. (C) Esquema temporal do experimento e da coleta enzimática bem como as aplicações dos produtos.

A inoculação foi realizada por meio da submersão das sementes em suspensão bacteriana e pela aplicação da solução de *Cff* no solo como descrito no item 3.2, tabela 2,

utilizando bomba costal. A aplicação do NAC foi realizada por meio dos produtos comerciais Cerealis e Cerealis TS (Amazon Agrosience), ambos contendo NAC em sua composição. O produto Cerealis foi aplicado via foliar, em três aplicações realizadas nos estádios fenológicos V4, R5 e R6, enquanto o produto Cerealis TS foi aplicado via solo, no sulco de plantio, conforme descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Descrição dos tratamentos, doses e formas de aplicação de produtos à base de NAC no experimento de campo.

<b>Tratamento</b>	<b>Dose por parcela (1,6 m<sup>2</sup>)</b>	<b>Procedimento</b>
Cerealis (2 L/ha <sup>-1</sup> )	3 x 0,11 mL	Pulverizado nos estádios V4, R5 e R6
Cerealis TS (2 L/ha <sup>-1</sup> ) + Cerealis (2 L/ha <sup>-1</sup> )	0,32 mL de TS + 3 x 0,11 mL de Cerealis	TS aplicado no suco de plantio + pulverização do Cerealis nos estádios V4, R5 e R6
Cerealis TS (2 L/ha <sup>-1</sup> ) + Cerealis (12,750 L/ha <sup>-1</sup> )	0,32 mL de TS + 3 x 0,68 mL de Cerealis	TS aplicado no suco de plantio + pulverização do Cerealis nos estádios V4, R5 e R6
Controle sem NAC	—	—

A avaliação dos sintomas da doença foi realizada a cada 7 dias após o surgimento dos sintomas, sendo aos 21, 28, 35, 42, 49 e 56 DAI, utilizando-se a escala de notas proposta por Maringoni (2002), descrita na Tabela 6. Os efeitos dos tratamentos no desenvolvimento das plantas foram avaliados com base na severidade dos sintomas, AUDPC, peso de grãos, produtividade, tempo de escurecimento dos grãos e na atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD), associadas à resposta de defesa das plantas, que foram coletas nos tempos de pré aplicação, 1, 3 e 7 dias após a 3 aplicação do Cerealis (**Figura 4C**).

No experimento de campo, a atribuição das notas de severidade foi realizada individualmente por planta, sendo a média das plantas utilizada como valor final da nota da parcela em cada data de avaliação. Dessa forma, adotou-se uma escala que representasse a condição geral da planta como um todo.

**Tabela 6:** Escala de notas para avaliação dos sintomas da murcha bacteriana causada por *Cff*, proposta por Maringoni (2002).

Valor de Escala	Sintomas analisados
0	Ausência de sintomas
1	Presença de mosaico nas folhas
2 - 4	Poucas folhas murchas (1 a 3 folhas; menos de 10% da planta)
5 - 6	Aproximadamente 25% das folhas com murcha e amarelecimento
7 - 8	Aproximadamente 50% das folhas murchas, com amarelecimento e necrose de folíolos; plantas com nanismo
9 - 10	Aproximadamente 75% ou mais das folhas com murcha e/ou necrose, queda prematura de folhas, nanismo severo e/ou morte da planta

### **3.5.1 Análise da atividade de enzimas antioxidantes**

#### **3.5.1.1 Obtenção do extrato enzimático**

A atividade das enzimas antioxidantes SOD e AXP foi determinada a partir de extratos obtidos de tecido vegetal foliar. Para isso, aproximadamente 300 mg de folhas frescas foram maceradas em presença de 20% de polivinilpolipirrolidona (PVPP), visando à remoção de compostos fenólicos, e homogeneizadas em 2,5 mL de tampão de extração composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5), contendo 1 mM de EDTA e 3 mM de ditioneitol (DTT), descrito por Gomes-Junior et al. (2006).

O material macerado foi centrifugado a 12.000 rpm por 35 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi coletado em alíquotas de 200 µL e armazenado a -80 °C até a realização das análises enzimáticas.

#### **3.5.1.2 Determinação do teor de proteínas**

O teor de proteínas totais nos extratos vegetais foi determinado por espectrofotometria a 595 nm, utilizando o método de Bradford (1976). Os valores obtidos foram empregados para o cálculo da atividade específica das enzimas antioxidantes, expressando os resultados em função da concentração proteica de cada amostra.

### **3.5.1.3 Atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada com base na capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme metodologia descrita por Giannopolitis e Ries (1977). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para promover 50% de inibição da fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

Para a reação, foram utilizados 50  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal, adicionados a 1,765 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), contendo 780  $\mu\text{L}$  de metionina 50 mM, 225  $\mu\text{L}$  de NBT 1 mM, 30  $\mu\text{L}$  de EDTA 10 mM e 150  $\mu\text{L}$  de riboflavina 0,1 mM. As amostras foram expostas à luz por 5 minutos e, posteriormente, a absorbância foi determinada a 560 nm, utilizando um leitor de microplacas Thermo Scientific Varioskan Flash Type 3001.

Foram utilizados dois ensaios-brancos: um branco exposto à luz juntamente com as amostras (branco A) e um branco mantido protegido da luz (branco B). As reações foram conduzidas em tubos Falcon de 15 mL, e as leituras realizadas em placas de 96 poços, em triplicata, com volume final de 300  $\mu\text{L}$ . Os resultados foram expressos em U SOD  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

### **3.5.1.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)**

A atividade da APX foi determinada conforme a metodologia proposta por Nakano e Asada (1981), baseada no monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato, avaliada pelo decréscimo da absorbância a 290 nm.

A reação foi conduzida utilizando 12,5  $\mu\text{L}$  do extrato vegetal, acrescidos de 162,5  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio 80 mM (pH 7,0), 25  $\mu\text{L}$  de ascorbato 5 mM, 25  $\mu\text{L}$  de EDTA 1 mM e 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mM. A variação da absorbância foi monitorada durante 1 minuto, com leituras a cada 10 segundos.

As análises foram realizadas em placas de 96 poços apropriadas para leitura a 290 nm, utilizando o leitor de microplacas Varioskan Flash. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de ascorbato oxidado  $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína.

## **3.5.2 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (v. 2025.09.2). Para todos os experimentos, os pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade de variâncias foram verificados previamente por meio dos testes de Shapiro–Wilk e Bartlett, respectivamente. O coeficiente de variação (CV) foi calculado para as principais variáveis de produtividade, sendo os valores observados considerados compatíveis com experimentos conduzidos sob condições de campo e inoculação artificial.

No ensaio de definição da concentração de inóculo (item 3.1) e no ensaio de avaliação dos métodos de inoculação (item 3.2), os valores de severidade ao longo do tempo e de AUDPC foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de comparação de médias pelo teste de Tukey, a 5% de significância ( $p \leq 0,05$ ). Para os parâmetros de produtividade avaliados no item 3.2 (número de vagens e número de sementes por vaso), as diferenças entre plantas inoculadas e não inoculadas dentro de cada tratamento foram avaliadas individualmente, sendo os resultados expressos com indicação de significância por asterisco ( $p \leq 0,05$ ).

No primeiro experimento em casa de vegetação com aplicação de NAC (item 3.3), os valores de AUDPC foram submetidos à ANOVA seguida do teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para comparação entre os tratamentos. No segundo experimento em casa de vegetação (item 3.4), as variáveis de produtividade (número de sementes por planta e peso total de grãos) foram submetidas à análise fatorial, com verificação do efeito da interação Tratamento  $\times$  Condição. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan ( $p \leq 0,05$ ) para comparações entre tratamentos dentro de cada condição, e por asteriscos para comparações entre condições (com e sem *Cff*) dentro de cada tratamento.

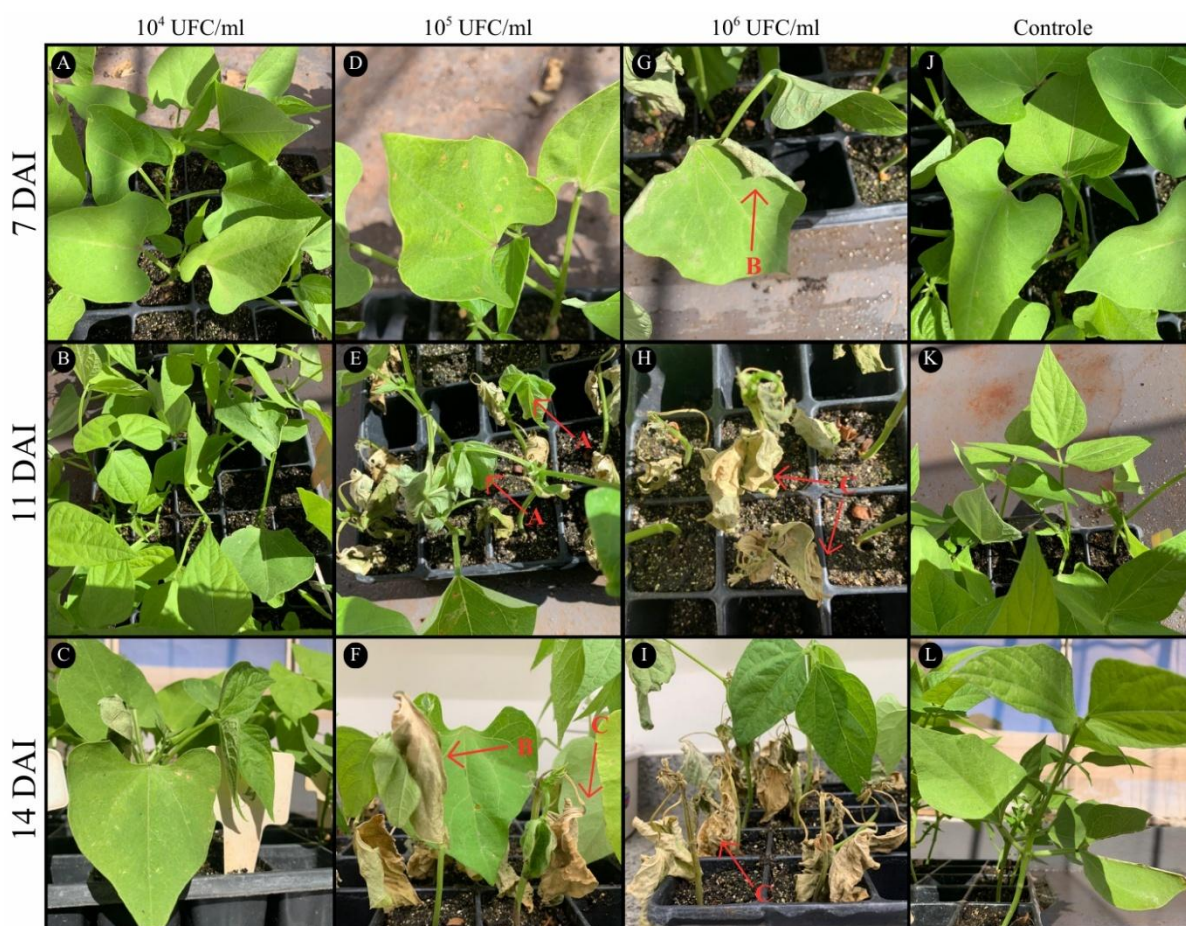
No experimento de campo (item 3.5), as variáveis quantitativas (severidade, AUDPC, germinação, número de sementes de qualidade comercial, número de sementes mal formadas, peso de 1000 sementes, peso total de sementes e produtividade estimada) foram submetidas à ANOVA. Quando significativo, as médias dos tratamentos foram comparadas ao controle sem NAC pelo teste de Dunnett, adotando-se os níveis de significância  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ .

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Severidade dos sintomas associados a concentração *Cff***

Para avaliar o efeito da concentração bacteriana utilizada na inoculação de plântulas de feijão, foram testadas suspensões de *Cff* nas concentrações de  $10^4$ ,  $10^5$  e  $10^6$  UFC/mL. Na concentração de  $10^4$  UFC/mL, não foram observados sintomas de murcha bacteriana ao longo do período de avaliação (**Figura 5A-C**), indicando que essa concentração não foi suficiente para promover o estabelecimento da doença.

Na concentração de  $10^5$  UFC/mL (**Figura 5D-F**), os primeiros sintomas característicos da murcha bacteriana foram observados a partir do 11º dia após inoculação (DAI) (**Figura 5E**), incluindo encarquilhamento e murcha foliar (seta A). No 14º DAI (**Figura 5F**), observou-se a intensificação dos sintomas, com o aparecimento de necrose foliar (seta B) e morte de plantas (seta C).



**Figura 5.** Severidade dos sintomas de murcha bacteriana em plântulas de feijoeiro inoculadas com diferentes concentrações de *Cff*. Plantas inoculadas com  $10^4$  UFC/mL (a–c),  $10^5$  UFC/mL (d–f) e  $10^6$  UFC/mL (g–i), avaliadas aos 7, 11 e 14 dias após a inoculação (DAI). O tratamento controle (j–l) corresponde a plantas sem *Cff* nos mesmos períodos de avaliação. Na concentração de  $10^5$  UFC/mL, observam-se sintomas típicos da doença, como murcha e encarquilhamento foliar (A), necrose foliar (B) e morte de plantas (C), com progressão gradual ao longo do tempo. Na concentração de  $10^6$  UFC/mL, os sintomas foram mais precoces e severos, resultando em rápida morte das plantas. Plantas inoculadas com  $10^4$  UFC/mL e os controles permaneceram assintomáticos durante todo o período avaliado.

Para a concentração de  $10^6$  UFC/mL (Figura 5G -I), foram observados sintomas severos já a partir do 7º DAI (**Figura 5G**), caracterizados por rápida progressão da doença, culminando na morte das plantas até o 11º DAI (**Figura 5H**). As plantas do controle negativo permaneceram assintomáticas durante todo o período de avaliação (**Figura 5J-L**).

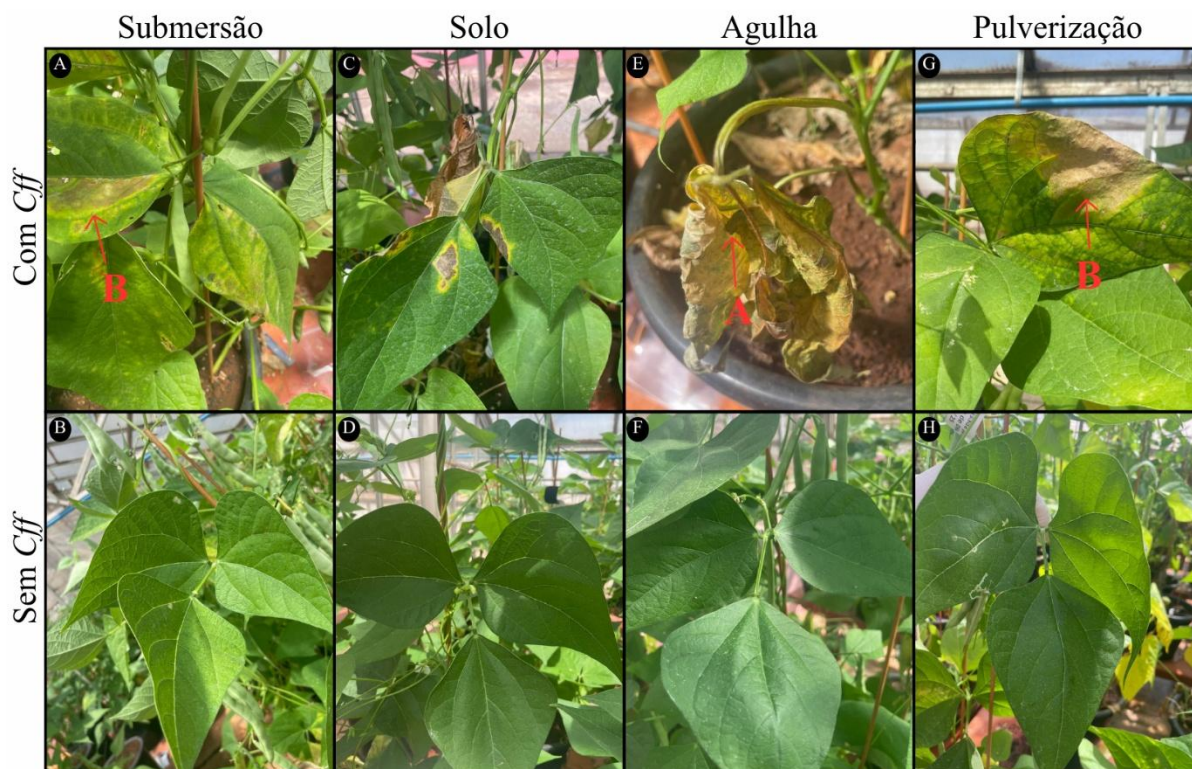
Dessa forma, observou-se uma relação direta entre a concentração de *Cff* utilizada na inoculação e a severidade dos sintomas da murcha bacteriana, bem como a velocidade de progressão da doença. A concentração de  $10^5$  UFC/mL permitiu a manifestação gradual e consistente dos sintomas, mantendo a viabilidade das plantas por período suficiente para a realização das avaliações experimentais, sendo, portanto, considerada a mais adequada para os experimentos subsequentes.

#### 4.2 Eficiência de métodos de inoculação na indução de sintomas de doença

A eficiência dos diferentes métodos de inoculação foi avaliada com o objetivo de identificar a estratégia mais adequada para a indução de sintomas de murcha bacteriana em plantas de feijoeiro, buscando aproximar as condições experimentais do processo natural de infecção em campo. Foram testadas quatro formas de inoculação de *Cff*: submersão de sementes, aplicação no solo, pulverização foliar e inoculação por agulha.

A inoculação por agulha foi o método que promoveu a visualização mais evidente dos sintomas da doença (**Figura 6E**), caracterizados por murcha nas folhas, encarquilhamento e necrose foliar (seta A) em plantas com 28 DAI, indicando colonização eficiente do patógeno e comprometimento do sistema vascular. A inoculação por submersão de sementes resultou em sintomas mais leves e localizados, principalmente necrose foliar discreta (**Figura 6A**; seta B), sugerindo infecção inicial, porém com menor progressão sistêmica da doença.

Os métodos de inoculação via solo (**Figura 6C**) e pulverização foliar (**Figura 6G**) apresentaram os menores níveis de severidade, com baixa expressão de sintomas visuais ao longo do período de avaliação, de acordo com a escala utilizada. As plantas controle, correspondentes a cada método, permaneceram assintomáticas.



**Figura 6.** Sintomas de murcha bacteriana em plantas de feijoeiro com 28 DAI, submetidas a diferentes métodos de inoculação com *Cff*. Plantas inoculadas por submersão de sementes (A), aplicação no solo (C), inoculação por agulha (E) e pulverização foliar (G). As respectivas plantas controle, não inoculadas, estão representadas em (B), (D), (F) e (H). Observam-se sintomas de necrose foliar discreta no tratamento por submersão (seta B) e sintomas severos de murcha, encarquilhamento e necrose no tratamento por agulha (seta A).

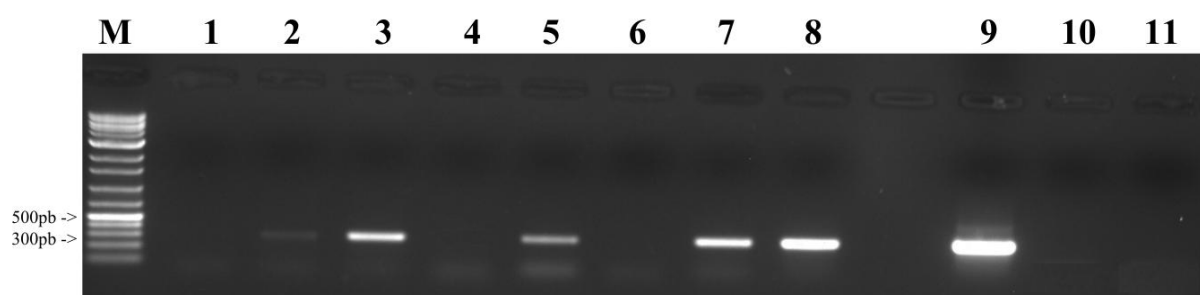
#### 4.2.1 Confirmação molecular da infecção por *Cff*

Com o intuito de verificar a presença do patógeno nos tratamentos inoculados, mas que não apresentaram sintomas visíveis aos 14 DAI, foi realizado diagnóstico molecular por PCR utilizando os primers específicos Cff1F/Cff1R. A amplificação do fragmento esperado de aproximadamente 308 pb foi detectada em todas as amostras inoculadas, confirmando a inoculação das plantas pelo patógeno, independentemente do método de inoculação empregado (**Figura 7**), e indicando a possibilidade de infecções assintomáticas.

Na análise do gel, os poços 1, 4, 6 e 7 correspondem aos controles não inoculados dos tratamentos por submersão, agulha, solo e pulverização, respectivamente, enquanto os poços 2, 3, 5 e 8 representam os respectivos tratamentos inoculados. O poço 9 corresponde ao controle

positivo (DNA da estirpe IBSBF 2869), enquanto os poços 10 e 11 correspondem aos controles negativos contendo DNA de *Xanthomonas citri* subs. *citri* e água Milli-Q (H<sub>2</sub>O), respectivamente.

Embora o tratamento por inoculação via solo e pulverização não tenham apresentado sintomas evidentes aos 14 DAI, a presença do amplicon específico de *Cff* confirma que a bactéria foi capaz de infectar e se estabelecer no hospedeiro (**Figura 7**, poço 5 e 8). De modo geral, todos os métodos testados foram eficientes na infecção do feijoeiro por *Cff*; entretanto, apenas a inoculação por agulha foi capaz de induzir sintomas claros e severos, sendo, portanto, selecionada para os experimentos subsequentes.

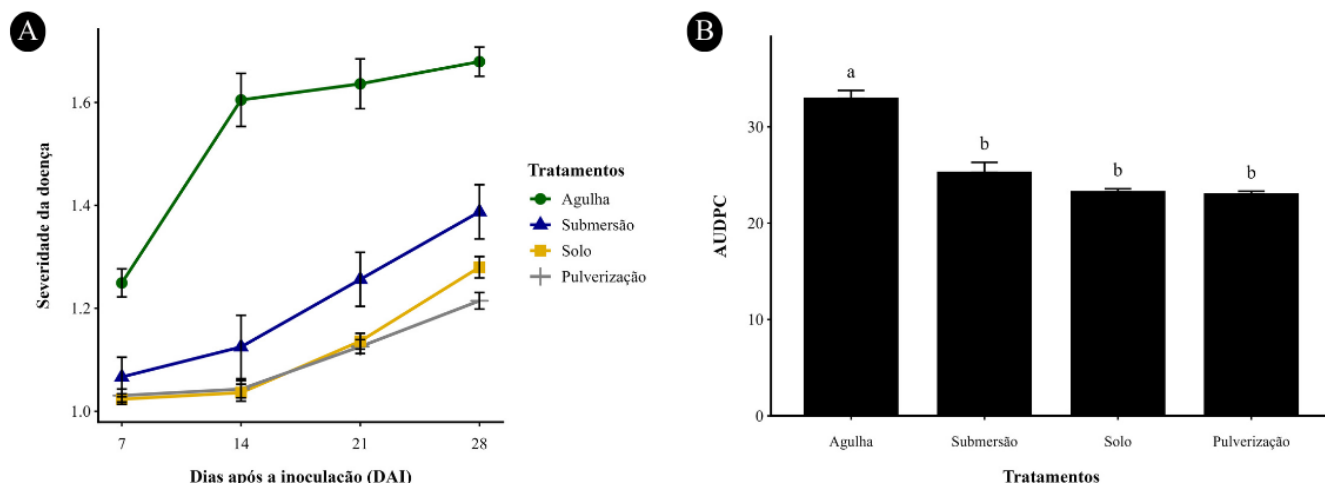


**Figura 7.** Detecção molecular de *Cff* em plantas de feijoeiro inoculadas por diferentes métodos, por meio de PCR utilizando os primers específicos Cff1F/Cff1R. M: marcador de peso molecular (100 pb). Poços 1, 4, 6 e 7: controles não inoculados correspondentes aos tratamentos por submersão, inoculação com agulha, infestação do solo e pulverização, respectivamente. Poços 2, 3, 5 e 8: amostras inoculadas por submersão, agulha, solo e pulverização, respectivamente. Poço 9: controle positivo (DNA da estirpe IBSBF 2869). Poço 10: controle negativo contendo DNA de *X. citri* subs. *citri*. Poço 11: controle negativo sem molde (H<sub>2</sub>O). A presença do fragmento de aproximadamente 308 pb confirma a infecção das plantas por *Cff*.

#### 4.2.2 Progressão da doença e AUDPC

A progressão dos sintomas da doença ao longo do tempo foi influenciada significativamente pela forma de inoculação (**Figura 8A**). Observou-se aumento gradual da severidade em todos os tratamentos inoculados, com intensidades distintas entre os métodos avaliados. As plantas inoculadas pelo método da agulha apresentaram sintomas mais precoces e severos, enquanto os tratamentos por pulverização, solo e submersão exibiram progressão mais lenta e níveis reduzidos de severidade ao longo do período avaliado. As plantas não inoculadas permaneceram assintomáticas durante todo o experimento, independentemente do tratamento, o que indica que a contaminação cruzada na figura 7 (poço 7), foi devido ao manuseio no laboratório, e não à pulverização da bactéria durante a inoculação.

A análise de variância (ANOVA) da severidade ao longo do tempo confirmou efeito significativo dos fatores tratamento, condição de inoculação e tempo, bem como de suas interações, indicando que o desenvolvimento da doença depende tanto da forma de inoculação quanto da presença do patógeno e do período após a inoculação. Esses resultados evidenciam que os métodos de inoculação diferem quanto à eficiência em promover a infecção e o progresso da doença.



**Figura 8.** Progressão da severidade da doença e AUDPC em plantas submetidas a diferentes formas de inoculação. (A) Evolução da severidade média da doença ao longo do tempo, avaliado aos 7, 14, 21 e 28 DAI. (B) Valores médios da AUDPC para cada tratamento. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos inoculados, de acordo com o teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

A AUDPC (**Figura 8B**) corroborou os resultados observados na avaliação temporal da severidade, em que houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados com *Cff*, sendo o método de inoculação por agulha responsável pelos maiores valores de AUDPC, indicando maior severidade dos sintomas ao longo do tempo. Os tratamentos por pulverização, solo e submersão apresentaram valores de AUDPC significativamente menores e estatisticamente semelhantes entre si, refletindo menor progresso da doença.

De forma geral, os resultados da progressão da doença e da AUDPC demonstram que a inoculação por agulha foi o método mais eficiente para o estabelecimento e desenvolvimento da doença, enquanto os demais métodos resultaram em infecção menos intensa. Possivelmente, essa diferença está relacionada ao fato de o patógeno colonizar o xilema, uma vez que, no método de inoculação por agulha, promove a introdução direta do patógeno nos vasos da planta, ao contrário dos demais métodos.

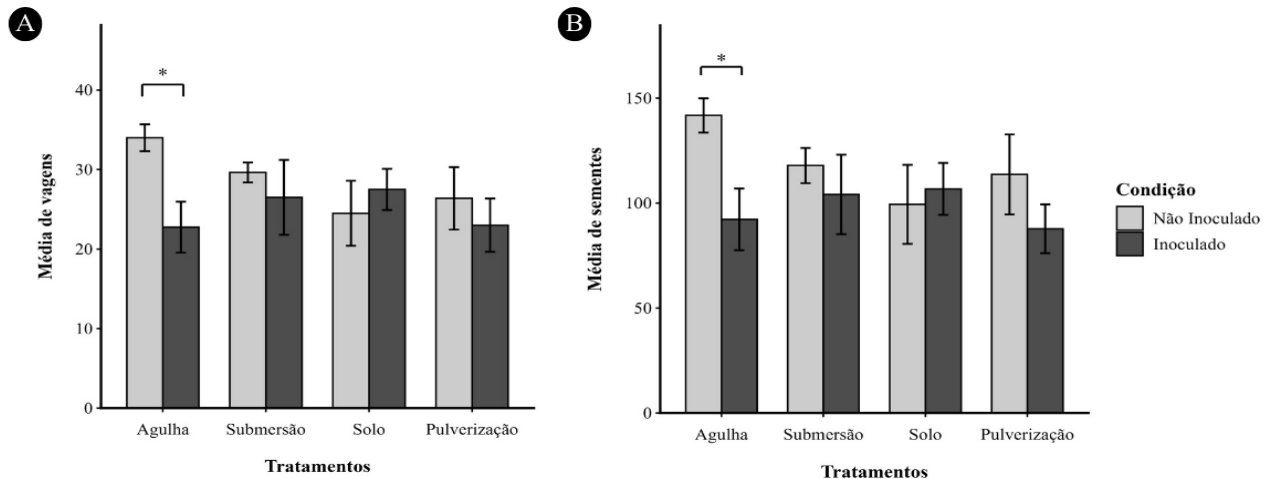
#### 4.2.3 Produção de sementes

A produção de sementes foi avaliada por meio do número de vagens por vaso, da soma de sementes por vaso e do número médio de sementes por vagem, considerando as diferentes formas de inoculação e as condições com e sem *Cff*. De modo geral, os efeitos observados na produção de sementes foram dependentes da forma de inoculação.

O número de vagens por vaso, indicou redução significativa apenas no tratamento por agulha (**Figura 9A**), no qual as plantas com *Cff* apresentaram menor número de vagens em comparação às plantas sem *Cff*. Nos demais tratamentos, não houve diferenças significativas entre as condições, sugerindo que a formação de vagens não foi afetada quando a severidade da doença é baixa, como observado quando *Cff* foi inoculado por submersão, solo ou pulverização (**Figura 6A, C e G**, respectivamente).

A média de sementes por vaso apresentou diferenças significativas entre plantas com e sem *Cff* apenas no tratamento por agulha, no qual as plantas com *Cff* produziram menor número de sementes em comparação às plantas sem *Cff* (**Figura 9B**). Nos tratamentos por submersão, solo e pulverização, não foram observadas diferenças significativas entre as condições, indicando que, a baixa severidade da doença observada nesses tratamentos, não impactou a produção total de sementes (**Figura 9B**).

De forma integrada, os resultados mostram que os efeitos da doença sobre a produção de sementes se concentraram principalmente na redução do número de vagens e, conseqüentemente, da produção total de sementes, especialmente no método de inoculação por agulha, no qual foram observados sintomas mais severos (**Figura 6E**), indicando que a redução da severidade da doença pode diminuir as perdas de produção de sementes, como observado nos demais tratamentos.



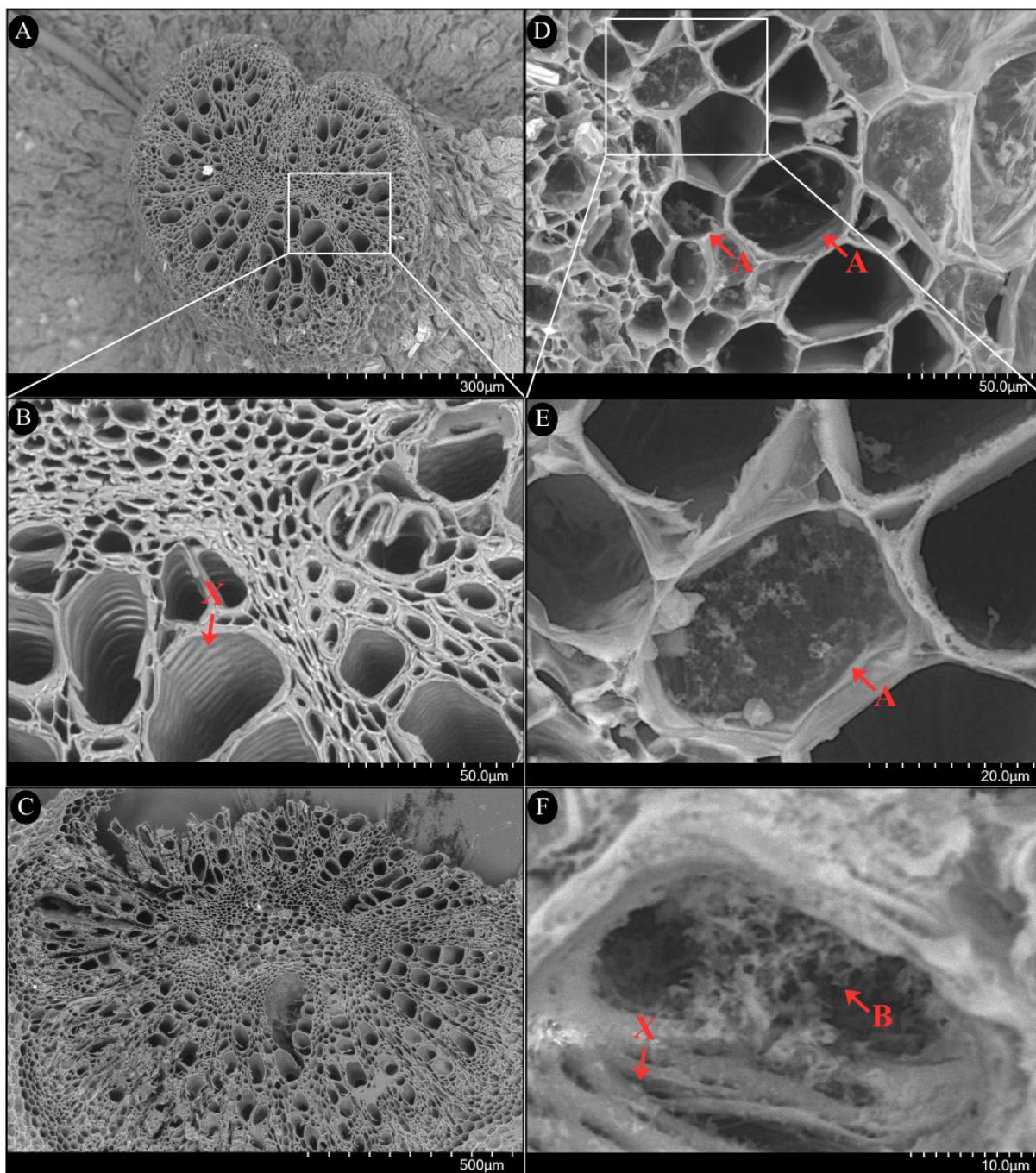
**Figura 9.** Componentes de produtividade de plantas submetidas a diferentes formas de inoculação. (A) Média do número de vagens por vaso em plantas com e sem *Cff*. (B) Média da soma de sementes por vaso em plantas com e sem *Cff* sob diferentes tratamentos. As barras representam a média  $\pm$  erro padrão. O asterisco (\*) indica diferença estatística significativa entre plantas inoculadas e não inoculadas dentro do mesmo tratamento, enquanto “ns” indica ausência de diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.4 Colonização vascular da *Cff* observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando a técnica de cryofracture, foram realizadas em tecidos vasculares de plantas de feijoeiro de amostras coletadas aos 14 dias após a inoculação, permitindo a visualização detalhada da organização do tecido vascular do caule e pecíolo sob os diferentes tratamentos (**Figura 10**).

Nas plantas controle sem *Cff*, do tratamento por agulha, observou-se preservação da arquitetura vascular típica do xilema, com vasos apresentando lúmens amplamente abertos e ausência de bloqueio dos vasos (**Figura 10A–C**). As paredes celulares mantiveram-se estruturalmente íntegras, sem evidências de material aderido ou estruturas compatíveis com colonização bacteriana.

Em contraste, nas plantas com *Cff* inoculadas por agulha, verificou-se alteração marcante da morfologia intravascular. Diversos vasos apresentaram o lúmen parcial ou quase totalmente preenchido por biofilme bacteriano de *Cff*, aderido às paredes vasculares (**Figura 10D–F**). Em maiores ampliações (10  $\mu\text{m}$ ), observou-se a presença de agregados celulares associados a matriz extracelular, formando estruturas organizadas compatíveis com biofilme bacteriano. Em alguns pontos, a obstrução dos vasos do xilema foi extensa (**Figura 10F**), indicando comprometimento significativo do fluxo vascular.

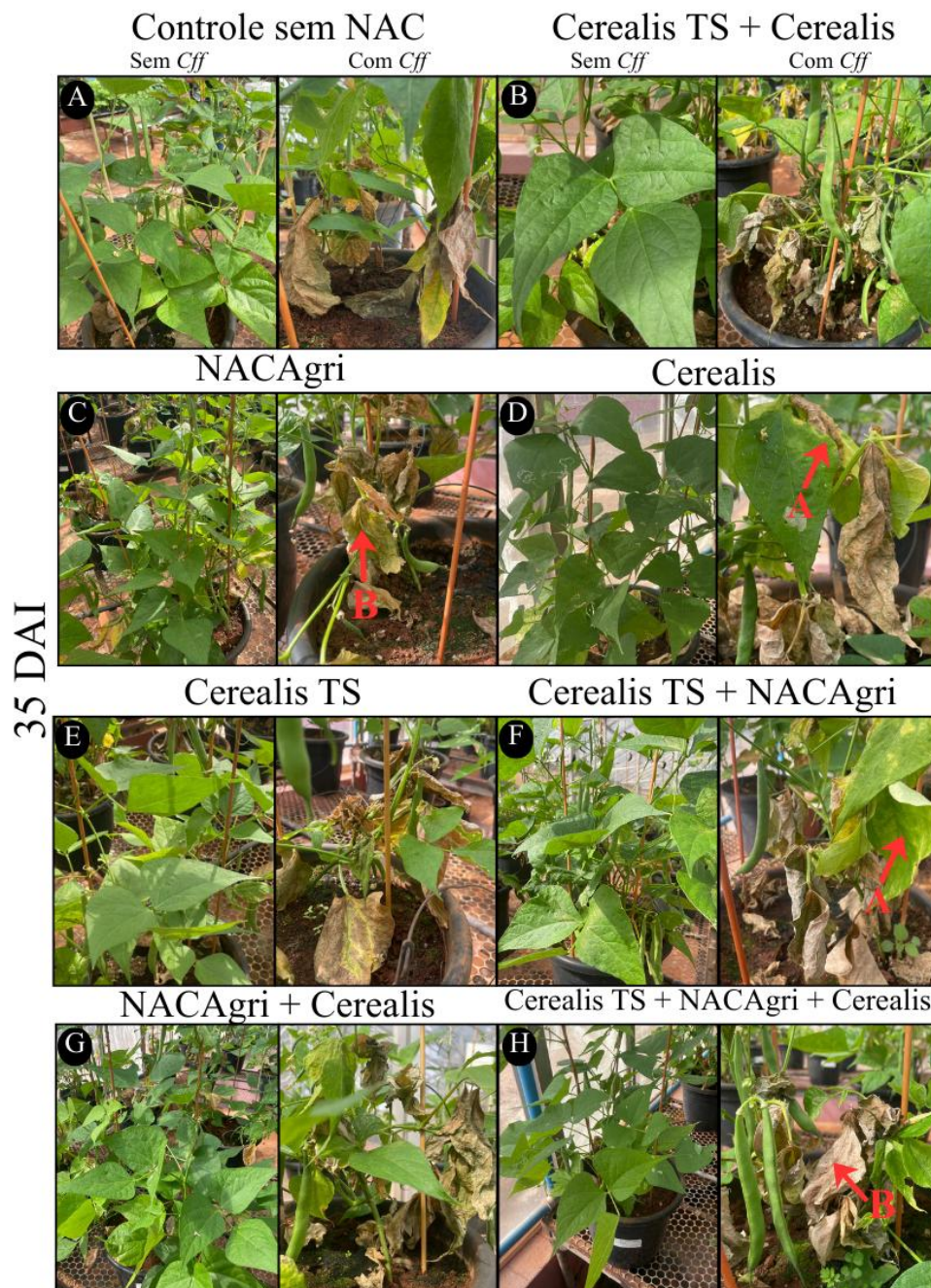


**Figura 10.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de tecidos vasculares do caule e pecíolos de feijoeiro com e sem *Cff*. (A-C) Plantas controle sem *Cff* do tratamento por agulha, mostrando organização preservada do feixe vascular, com vasos do xilema sem obstrução (A: barra = 300 μm; B: barra = 50 μm; C: barra = 500 μm). (D-F) Plantas com *Cff* inoculadas por agulha, é possível ver vasos do xilema com obstrução compatível com agregados bacterianos (Setas A e B) (D: barra = 50 μm; E: barra = 20 μm; F: barra = 10 μm). As setas com a letra X indicam elementos do xilema.

### 4.3 Efeito das diferentes formas de aplicação do NAC na sintomatologia da murcha bacteriana

Com o objetivo de avaliar se a aplicação do NAC pode ser utilizada no controle da murcha bacteriana e sua progressão ao longo do tempo, as plantas foram submetidas a diferentes estratégias de aplicação, por via dos produtos Cerealis (via foliar), Cerealis TS (semente) e NACAgrri (via solo), bem como suas combinações fatoriais. Esses tratamentos foram avaliados sob condições de casa-de-vegetação, em plantas com ou sem *Cff*.

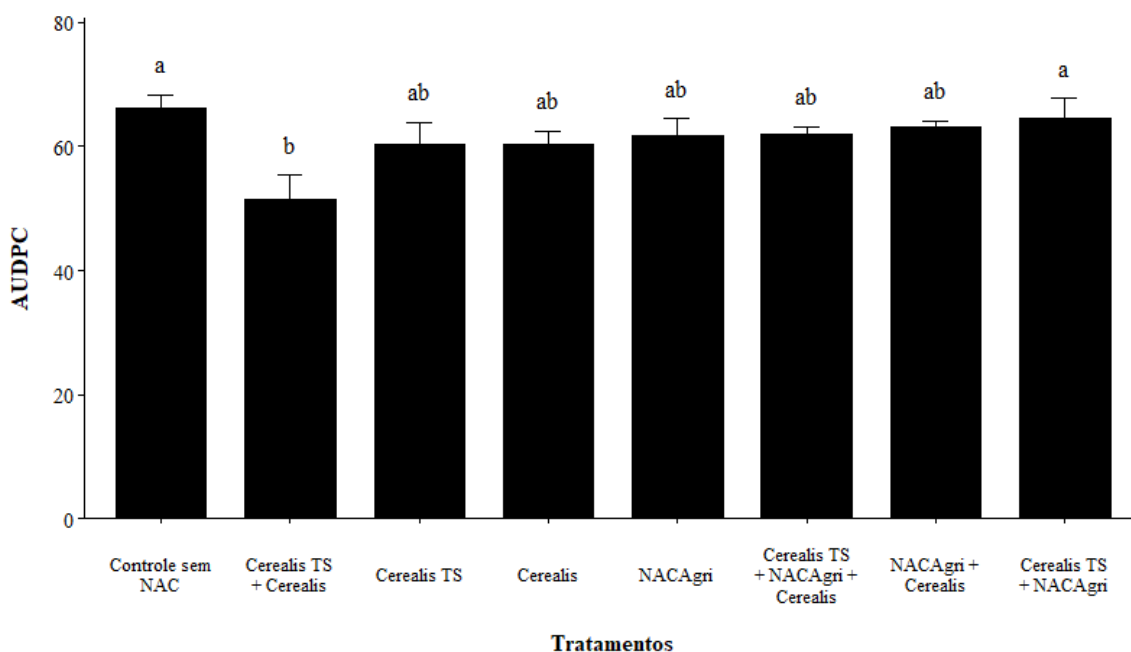
Com o avanço do ciclo da cultura, aos 35 DAI, os sintomas tornaram-se mais severos nas plantas inoculadas (**Figura 11**), independentemente do tratamento aplicado. Observou-se murcha acentuada, necrose foliar, perda de funcionalidade prematura das folhas, acompanhadas de intensa perda de área foliar em diversos tratamentos. Nas Figuras 11D e 11F, as setas A indicam regiões de amarelamento e encarquilhamento foliar, evidenciando comprometimento fisiológico das folhas. Já nas Figuras 11C e 11H, as setas B destacam áreas de necrose intensa e morte das plantas, caracterizando estágios avançados da doença.



**Figura 11.** Aspecto visual das plantas aos 35 DAI, em condições de casa-de-vegetação sob diferentes tratamentos com NAC. Para cada tratamento, são apresentadas plantas sem *Cff* (esquerda) e com *Cff* (direita). As setas A indicam regiões de amarelamento e enarquilhamento foliar, enquanto as setas B indicam necrose severa e morte das plantas.

### 4.3.1 Área abaixo da curva de progressão da doença (AUDPC)

A progressão temporal da severidade da doença foi confirmada pelas análises quantitativas da AUDPC, apresentadas na Figura 12, que evidenciou diferenças entre os tratamentos, indicando variação na severidade acumulada da doença ao longo do tempo. O tratamento Cerealis TS + Cerealis apresentou os menores valores de AUDPC (**Figura 12**), enquanto o controle sem NAC e o tratamento Cerealis TS + NACAgrri apresentaram os maiores valores. Os demais tratamentos apresentaram valores intermediários, não diferindo estatisticamente entre si.



**Figura 12.** Área abaixo da curva de progresso da doença (AUDPC) em plantas com *Cff* submetidas a diferentes tratamentos com NAC, representando a intensidade acumulada da doença ao longo do período avaliado. As barras representam a média ± erro padrão. Tratamentos seguidos por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### 4.4 Efeito das formas de aplicação selecionadas, sobre os parâmetros de produtividade

Com base nos resultados obtidos no experimento do item 4.3 conduzido em casa-de-vegetação, foi realizado um segundo ensaio com foco na avaliação dos parâmetros de produtividade. A seleção dos tratamentos para este experimento foi definida a partir do desempenho observado no item 4.3.1 quanto aos valores da AUDPC.

O tratamento Cerealis TS + Cerealis foi selecionado por ter apresentado os menores valores médios de AUDPC no experimento anterior (**Figura 12**). Além disso, os tratamentos Cerealis e NACAgrri foram incluídos por representarem formas isoladas de aplicação do NAC e por terem apresentado médias de AUDPC estatisticamente semelhantes aos demais tratamentos avaliados, permitindo comparar diferentes estratégias de aplicação do NAC.

Assim, o segundo experimento foi estruturado para verificar se as diferenças observadas previamente no progresso da doença poderiam refletir em variações nos parâmetros de produtividade em cada tratamento, sendo eles número de sementes por planta, o peso total de grãos e a porcentagem de redução produtiva da doença.

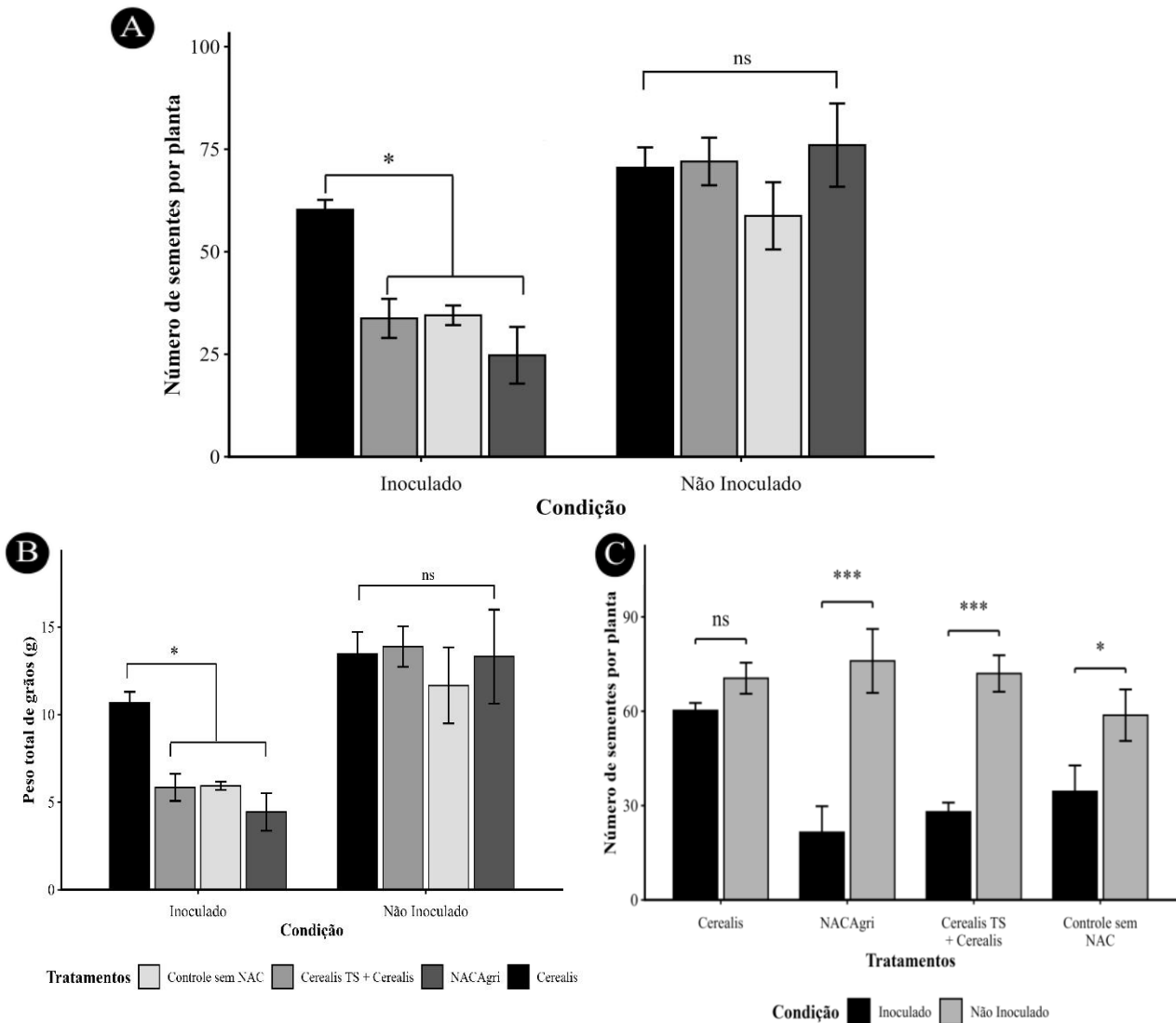
#### 4.4.1 Parâmetros de produtividade

A inoculação bacteriana influenciou significativamente os parâmetros produtivos avaliados, sendo observados efeitos distintos entre os tratamentos. A análise fatorial revelou efeito significativo da interação entre Tratamento  $\times$  Condição ( $p < 0,05$ ) para número de sementes e peso de grãos, indicando que a resposta à inoculação variou entre os tratamentos.

Observa-se que a inoculação do patógeno reduziu significativamente os parâmetros produtivos em comparação às plantas sem *Cff*. Entre os tratamentos aplicados às com *Cff*, destaca-se o NAC via Cerealis (**Figura 13A**), que apresentou desempenho superior em relação aos demais tratamentos contendo NAC. Embora todos os tratamentos tenham sido conduzidos com a mesma concentração da molécula, o efeito observado variou conforme a forma de aplicação. O tratamento via Cerealis, aplicado por via foliar, manteve valores de número de sementes e peso de grãos significativamente mais elevados quando comparado aos demais tratamentos com *Cff* (**Figura 13A e B**), aproximando-se dos valores observados nas plantas sem *Cff* (**Figura 13C**).

Em contraste, as demais formas de aplicação de NAC não promoveram recuperação produtiva equivalente, indicando que a eficiência da molécula está diretamente relacionada à estratégia de entrega ao tecido vegetal. A aplicação foliar provavelmente favoreceu maior disponibilidade do composto nos tecidos vasculares.

Esses resultados indicam que, embora a concentração de NAC tenha sido mantida constante entre os tratamentos, a forma de aplicação foi determinante para o desempenho agrônomico, sendo a aplicação via Cerealis a estratégia mais eficiente para mitigar os impactos produtivos da murcha bacteriana.



**Figura 13.** Efeito do patógeno sobre (A) número de sementes por planta e (B) peso total de grãos por planta em diferentes tratamentos com NAC (C) Número de sementes por planta comparando entre tratamentos com e sem o *Cff*. Barras representam médias  $\pm$  erro padrão ( $n = 4$ ). Letras distintas indicam diferenças significativas entre tratamentos dentro de cada condição (teste de Duncan,  $p \leq 0,05$ ). Asteriscos indicam diferenças significativas entre condições (com e sem *Cff*) dentro de cada tratamento (\*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ; ns = não significativo).

#### 4.5 Experimento em condições de campo: progresso da doença, produtividade e qualidade de sementes em plantas tratadas com o NAC

O experimento de campo foi conduzido no mês de setembro de 2025, com colheita realizada em dezembro de 2025, em DIC, em esquema fatorial  $2 \times 4$ , composto por duas condições de inoculação (com e sem *Cff*) e quatro tratamentos com NAC. Cada tratamento foi composto por três repetições, totalizando 24 parcelas experimentais (**Figura 14**).

Os tratamentos avaliados foram: 1) Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); 2) Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); 3) Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>); 4) Controle sem NAC. A Figura 16 apresenta a vista aérea do croqui experimental, evidenciando a distribuição casualizada das parcelas no campo, bem como a distinção entre tratamentos com *Cff* (T1 a T4) e sem *Cff* (T5 a T8).



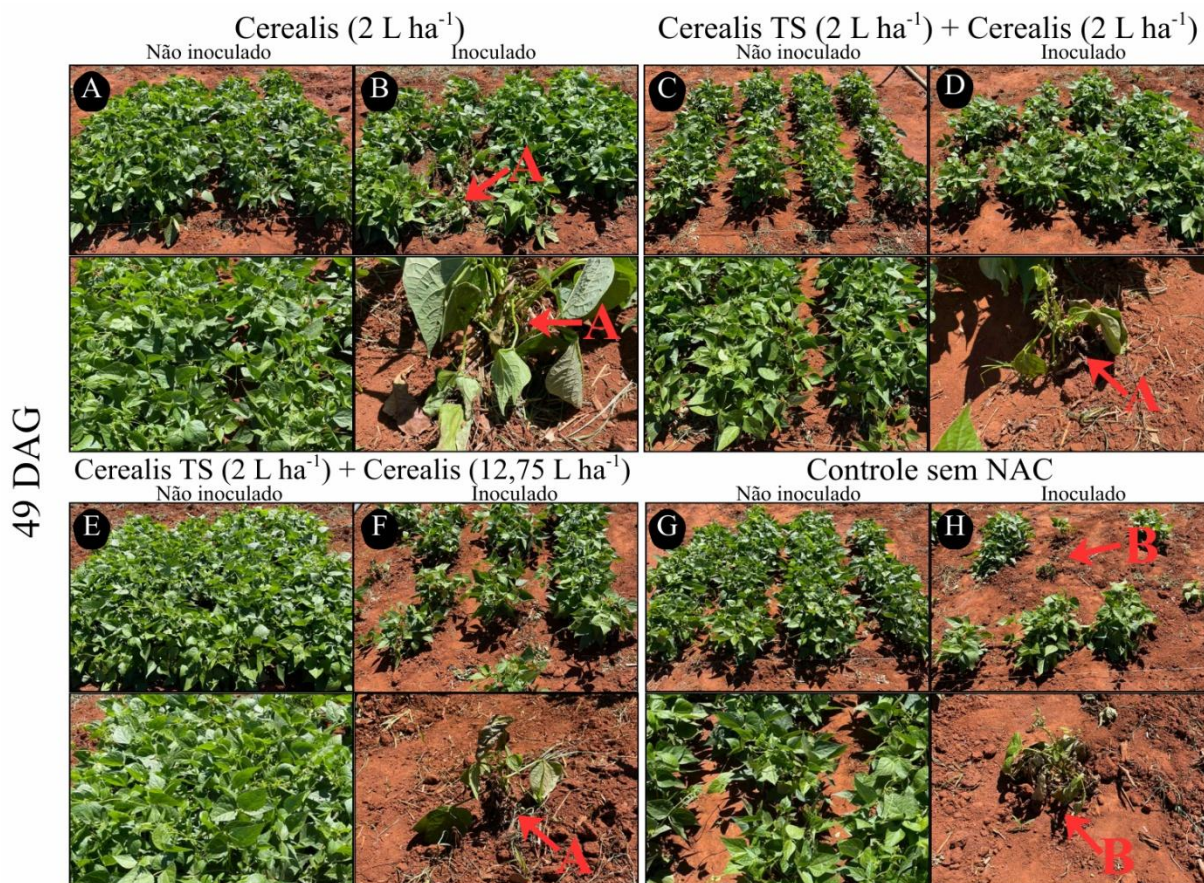
**Figura 14.** Vista aérea do experimento de campo conduzido em DIC com 50 DAG, em esquema fatorial 2 × 4, composto por duas condições (com e sem *Cff*) e quatro tratamentos com NAC: 1) Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); 2) Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); 3) Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>); 4) Controle sem NAC. As parcelas T1 a T4 correspondem aos tratamentos com *Cff*, enquanto T5 a T8 representam os tratamentos sem *Cff*. Cada tratamento foi composto por três repetições (p1, p2 e p3), totalizando 24 parcelas experimentais. Os pontos em branco indicam o alinhamento do drone.

Durante o desenvolvimento das plantas, foram observadas diferenças visuais entre as condições de inoculação, especialmente nos tratamentos com *Cff* sem aplicação de NAC. Aos 49 dias após a germinação (DAG) (**Figura 15**) é observada diferença entre os sintomas variando entre os tratamentos.

Na Figura 15A e B, observa-se que, na ausência do patógeno (A), as plantas apresentam desenvolvimento vegetativo uniforme e bom fechamento de entrelinhas. Já na condição com *Cff* (B), é possível visualizar uma redução do vigor e pequenos espaços vazios ao longo da linha

da parcela, apresentando plantas com sintomas iniciais de murchamento (seta A), caracterizados por perda de turgidez e leve encurvamento foliar.

Nas letras C e D da Figura 15, a condição sem *Cff* (C) demonstra bom estabelecimento e crescimento homogêneo. Na condição com *Cff* (D), é observado menor desenvolvimento das plantas na parcela comparado com o tratamento inoculado anterior, a seta A indica sintomas iniciais de murchamento.



**Figura 15.** Aspecto visual das parcelas do campo aos 49 DAG, evidenciando sintomas associados à doença nas plantas com *Cff*. As setas indicadas pela letra A destacam plantas com sintomas iniciais de murchamento e perda de turgidez foliar, enquanto as setas indicadas pela letra B evidenciam plantas em estágios mais avançados da doença, caracterizadas por murchamento severo, necrose e redução do desenvolvimento vegetativo. As imagens estão organizadas conforme os tratamentos com aplicação de NAC (Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup>; Cerealis TS 2 L ha<sup>-1</sup> + Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup>; Cerealis TS 2 L ha<sup>-1</sup> + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup>) e o controle sem NAC, nas condições com e sem *Cff*.

Na figura 15E, é observado elevado vigor vegetativo e maior densidade foliar comparado com outros tratamentos na mesma condição. Na condição com *Cff* (F), embora haja plantas sintomáticas (seta A), observa-se manutenção parcial do desenvolvimento vegetativo quando comparado ao controle inoculado (**Figura 15H**).

Na letra G da figura 15, as plantas apresentam crescimento adequado, embora com menor uniformidade quando comparadas aos tratamentos 1 e 3 (Figura 15A e E). Na Figura

15H, nota-se maior severidade da doença, com plantas em estágios avançados de infecção (setas B), em que foi evidenciado murchamento acentuado, necrose, e redução significativa do desenvolvimento vegetativo.

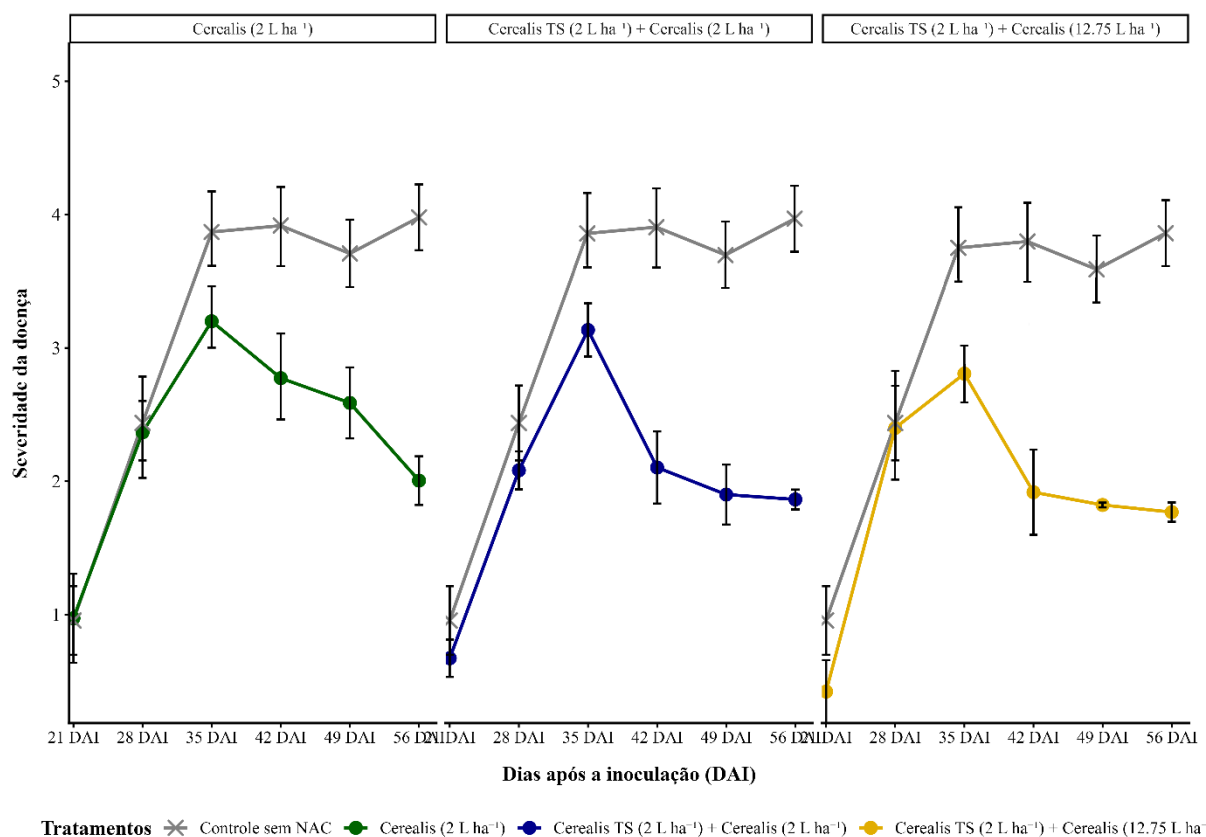
Visualmente, os tratamentos com *Cff* sem aplicação de NAC apresentaram maior severidade de sintomas quando comparados às parcelas tratadas, sugerindo um possível efeito positivo do NAC em reduzir o progresso da doença em condições de campo.

#### **4.5.1 Progresso da doença e AUDPC**

A evolução da severidade da doença ao longo do ciclo é apresentada na Figura 16. De modo geral, os primeiros sintomas foram observados aos 21 DAI, com aumento progressivo da severidade até aproximadamente 35 DAI. A partir desse período, observou-se estabilização ou discreta redução nos tratamentos com aplicação de NAC, enquanto o controle sem NAC manteve níveis elevados de severidade até o final das avaliações (56 DAI).

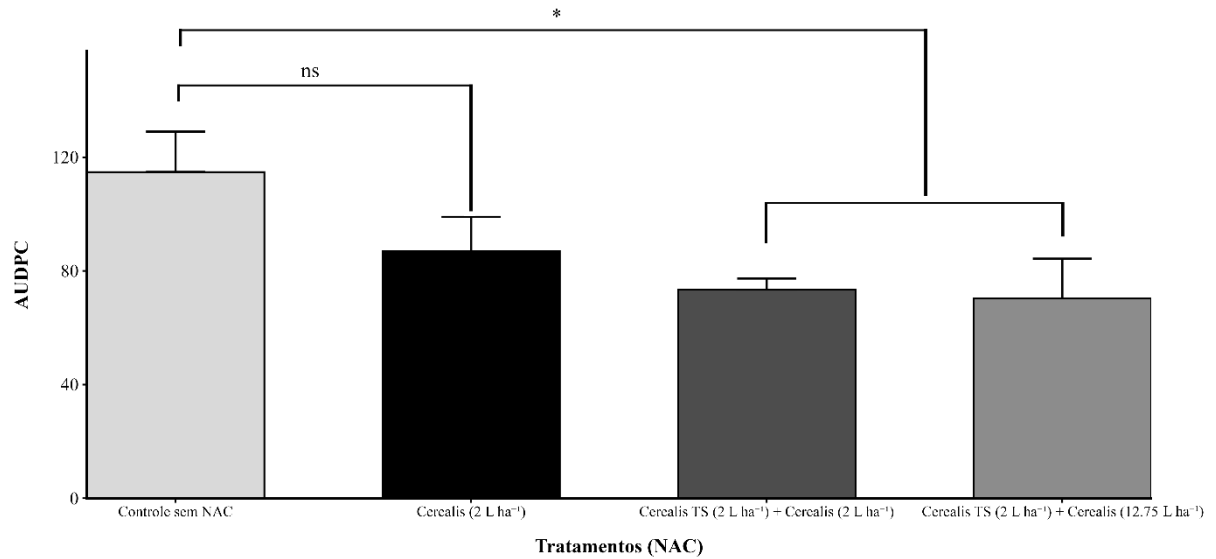
O tratamento Controle sem NAC apresentou os maiores valores de severidade em praticamente todas as datas avaliadas, com pico próximo a 35 DAI e permaneceu superior aos demais tratamentos até o encerramento das avaliações. Em contraste, os tratamentos com aplicação de NAC apresentaram menor intensidade da doença ao longo do tempo.

Embora as curvas de progresso apresentem comportamento semelhante entre os tratamentos nas fases iniciais, as diferenças tornam-se mais evidentes a partir de 35 DAI, indicando efeito do NAC na redução da progressão da doença.



**Figura 16.** Evolução da severidade da doença ao longo do tempo em plantas de feijão submetidas a diferentes tratamentos com NAC, com *Cff* em experimento de campo. A severidade foi avaliada aos 21, 28, 35, 42, 49 e 56 DAG. Cada painel representa um tratamento com NAC: Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>); e Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>). Em todos os painéis, a linha cinza representa o controle sem NAC, enquanto as linhas coloridas representam os respectivos tratamentos com NAC. Os pontos indicam as médias da severidade da doença e as barras verticais representam o erro padrão da média.

A AUDPC foi significativamente menor na maioria dos tratamentos com NAC (**Figura 17**). Observou-se que o controle sem NAC apresentou os maiores valores, evidenciando maior intensidade acumulada da doença ao longo do período de avaliação. Os tratamentos que tiveram o NAC via tratamento de semente (Cerealis TS) promoveram redução significativa da AUDCP em comparação ao controle sem NAC, uma vez que o patógeno foi inoculado via solo e submersão das sementes em suspensão bacteriana, indicando que o NAC via tratamento de semente pode ter contribuído com a menor severidade observada.

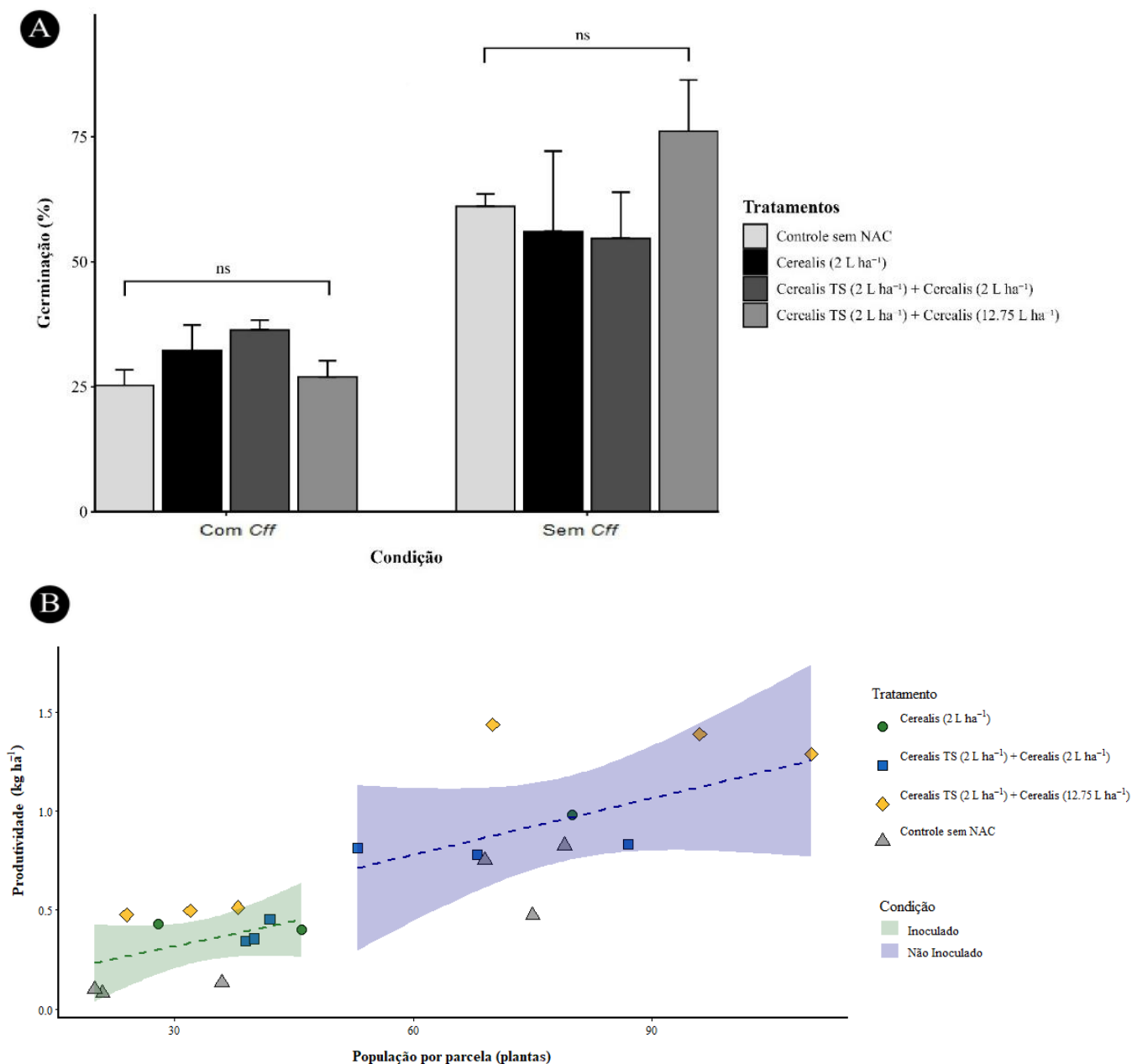


**Figura 17.** AUDPC em plantas de feijão inoculadas com *Cff*, submetidas a diferentes tratamentos com NAC em experimento de campo. Barras representam as médias da AUDPC e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Asteriscos indicam diferença significativa em relação ao controle sem NAC dentro das condições com e sem patógeno ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ).

#### 4.5.2 Germinação e estande inicial

Na condição com *Cff*, os percentuais de germinação variaram entre os tratamentos, porém as diferenças observadas não foram estatisticamente significativas (**Figura 18A**). Os valores médios situaram-se aproximadamente entre 25% e 37%, indicando desempenho semelhante entre o controle sem NAC e os tratamentos contendo Cerealis isolado ou em associação com Cerealis TS. De forma semelhante, na condição sem *Cff*, embora se observe variação numérica entre os tratamentos, não foram detectadas diferenças estatísticas entre o controle e os tratamentos com NAC.

Entretanto, quando comparadas as duas condições experimentais, verificou-se que a germinação foi maior na ausência do *Cff* em todos os tratamentos. Assim, a inoculação com *Cff* resultou em redução expressiva da germinação das sementes.



**Figura 18.** Germinação e produtividade do feijoeiro submetido a diferentes tratamentos com NAC, com e sem inoculação, em experimento de campo. (A) Porcentagem de germinação por parcela. (B) Relação entre a população de plantas por parcela aos 42 dias após a inoculação (DAI) e a produtividade (kg ha<sup>-1</sup>), nas condições inoculada e não inoculada. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Contrastes entre cada produto e o controle sem NAC foram realizados pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Em (A), não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos dentro de cada condição.

A relação entre a população final de plantas e a produtividade (**Figura 18B**) indicou uma tendência positiva em ambas as condições avaliadas, sugerindo que maiores estandes estão associados a maiores níveis de produtividade. No entanto, essa associação não foi estatisticamente significativa, tanto para as parcelas inoculadas quanto para as não inoculadas ( $p > 0,05$ ).

Observa-se uma clara separação entre as condições: as parcelas não inoculadas apresentaram, de forma consistente, maiores valores de população e produtividade, enquanto as inoculadas se concentraram em faixas inferiores dessas variáveis. Esse padrão reforça o impacto negativo da inoculação sobre o desempenho da cultura.

Apesar da ausência de significância estatística na correlação, a tendência observada sugere que a redução na produtividade está associada, ao menos em parte, à diminuição do estande de plantas. Entretanto, os resultados indicam que outros fatores, além da população final, também contribuíram para a variação da produtividade, especialmente sob condição de inoculação.

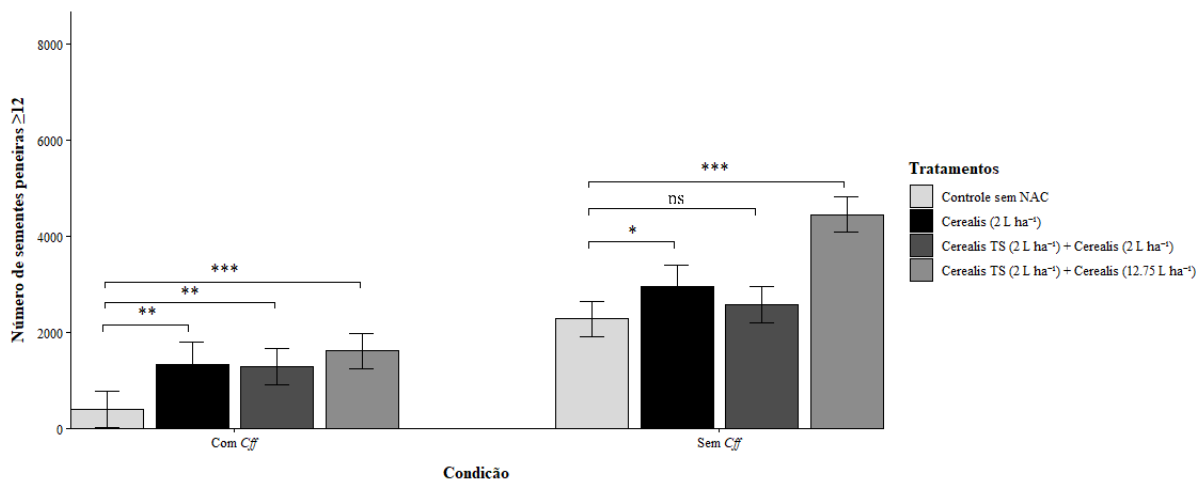
Além disso, independentemente da condição de inoculação, observa-se que os tratamentos com aplicação de NAC apresentaram, de modo geral, maiores valores de produtividade em comparação ao controle sem NAC. Esse comportamento é consistente ao longo da faixa de população avaliada e sugere um efeito positivo dos tratamentos na manutenção do desempenho produtivo, mesmo sob variações no estande de plantas. Em conjunto, esses dados demonstram que a inoculação comprometeu simultaneamente o estabelecimento da cultura e o potencial produtivo.

#### 4.5.3 Componentes de produtividade em condições de campo

Para a avaliação dos componentes de produção, as sementes foram classificadas quanto à qualidade física por meio de peneiramento em peneira nº12, sendo grãos de qualidade comercial. Foram consideradas aquelas retidas na peneira, apresentando tamanho comercial mínimo, maior uniformidade e melhor padrão físico. Já as sementes que passaram pela peneira 12, são predominantemente sementes pequenas, mal formadas, com tegumento enrugado, deformações ou desenvolvimento incompleto, características que reduzem seu valor comercial e, frequentemente, seu potencial fisiológico.

O número de sementes de qualidade comercial foi influenciado pelos tratamentos com NAC e pela condição de inoculação (**Figura 19**). Na condição com *Cff*, o controle sem NAC apresentou os menores valores de sementes boas. Todos os tratamentos com NAC promoveram aumento significativo no número de sementes de qualidade comercial em relação ao controle, evidenciando efeito positivo do produto. O tratamento Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>) apresentou o maior incremento, destacando-se entre os demais tratamentos.

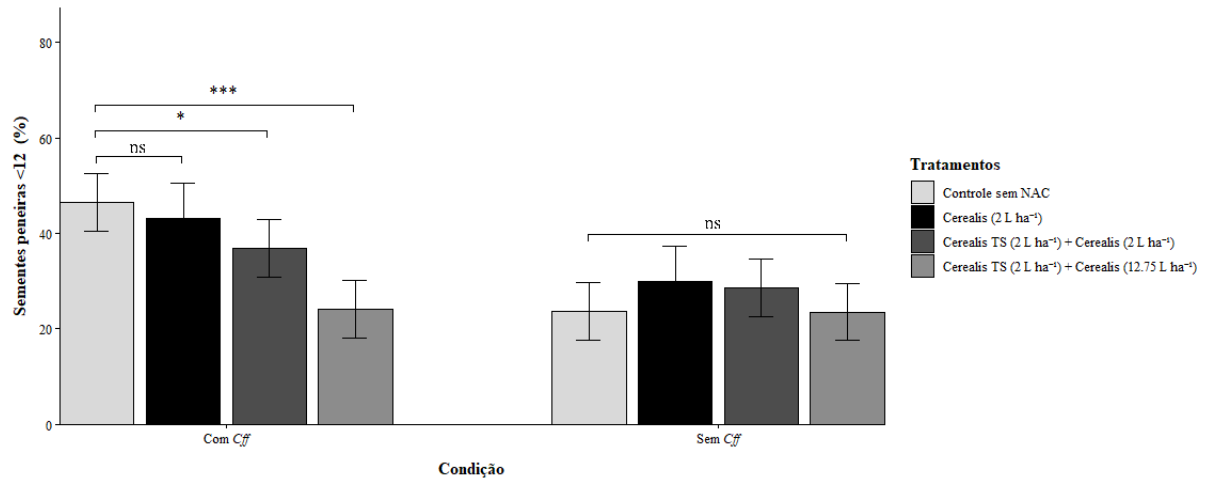
Na condição sem *Cff*, o número de sementes de qualidade comercial foi superior ao observado sob o patógeno em todos os tratamentos. O tratamento Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>) e a combinação Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>) diferiram significativamente do controle sem NAC.



**Figura 19.** Número de sementes de qualidade comercial produzidas por feijoeiros submetidas a diferentes tratamentos com NAC, com e sem *Cff*, em experimento de campo. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os colchetes e asteriscos indicam diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle sem NAC dentro de cada condição (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Para o número de sementes mal formadas, observou-se comportamento distinto entre as condições avaliadas (**Figura 20**). Na condição com *Cff*, o controle sem NAC apresentou os maiores valores de sementes mal formadas. Os tratamentos com NAC via tratamento de semente (TS) reduziram o número de sementes inviáveis, sendo a redução mais expressiva observada na combinação Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>).

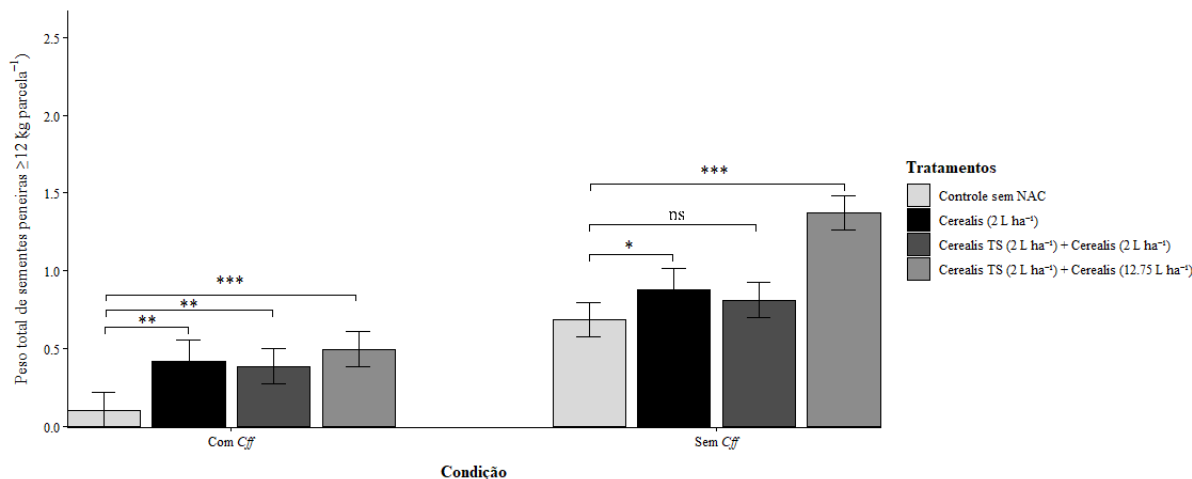
Na condição sem *Cff*, não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos para o número de sementes mal formadas, indicando que a aplicação de NAC não alterou significativamente essa variável na ausência do patógeno.



**Figura 20.** Porcentagem de sementes mal formadas produzidas por feijoeiro, submetidas a diferentes tratamentos com NAC, com e sem *Cff*, em experimento de campo. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os colchetes e asteriscos indicam diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle sem NAC dentro de cada condição (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

O peso total de sementes de qualidade comercial por parcela foi influenciado pelos tratamentos com NAC e pela condição de inoculação (**Figura 21**). Na condição com *Cff*, o controle sem NAC apresentou os menores valores de peso total de sementes. Todos os tratamentos com NAC promoveram aumento significativo em relação ao controle, evidenciando efeito positivo do produto sob estresse biótico. O maior incremento foi observado na dose mais altas do NAC, sendo altamente significativo.

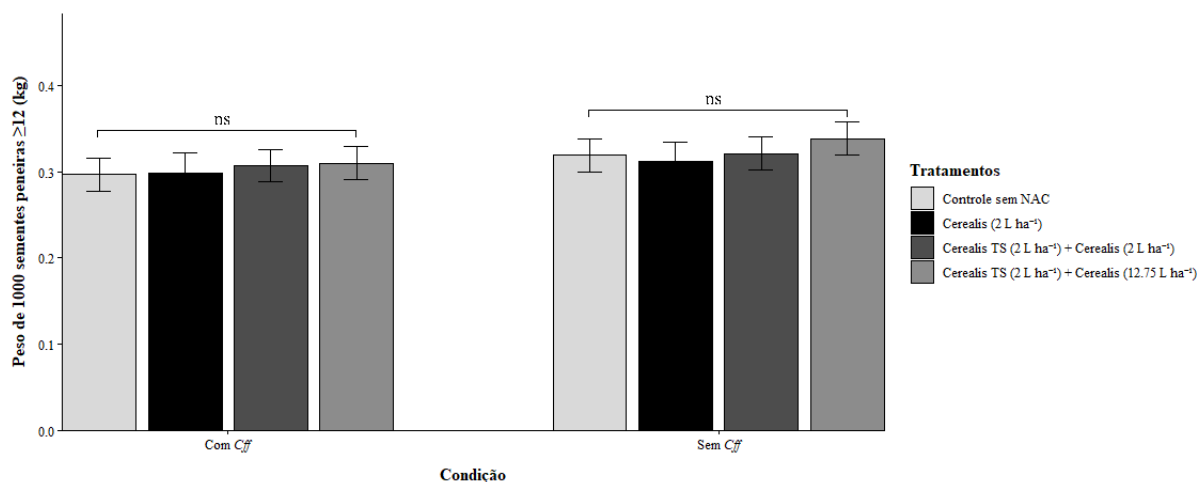
Na condição sem *Cff*, os valores de peso total de sementes foram superiores aos observados sob inoculação. O tratamento Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>) e a combinação Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>) apresentaram diferença significativa em relação ao controle sem NAC. De maneira geral, observa-se que o melhor efeito do NAC foi na condição em que a planta estava com *Cff*.



**Figura 21.** Peso total de sementes de qualidade comercial produzidas por plantas de feijão submetidas a diferentes tratamentos com NAC, com e sem *Cff*, em experimento de campo. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Em cada condição, são apresentados o controle sem NAC e os tratamentos Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>), Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>) e Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>). Os colchetes e asteriscos indicam diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle sem NAC dentro de cada condição (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

O peso de 1000 sementes com qualidade comercial apresentou baixa variação entre os tratamentos com NAC dentro de cada condição, mas foi influenciado pela presença do patógeno (**Figura 22**). Na condição com *Cff*, os valores médios de peso de 1000 sementes foram semelhantes entre o controle sem NAC e os tratamentos contendo Cerealis, isolado ou em associação com Cerealis TS, não sendo observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos dentro dessa condição. Resultado semelhante foi verificado na condição sem *Cff*.

De maneira geral, os resultados indicam que os tratamentos com NAC influenciaram significativamente o número de sementes de qualidade comercial produzidas por parcela, especialmente sob condição de inoculação por *Cff*. Dessa forma, os incrementos observados em peso total de sementes e produtividade estimada estão associados principalmente ao aumento na quantidade de sementes formadas, e não ao aumento do peso unitário das sementes.



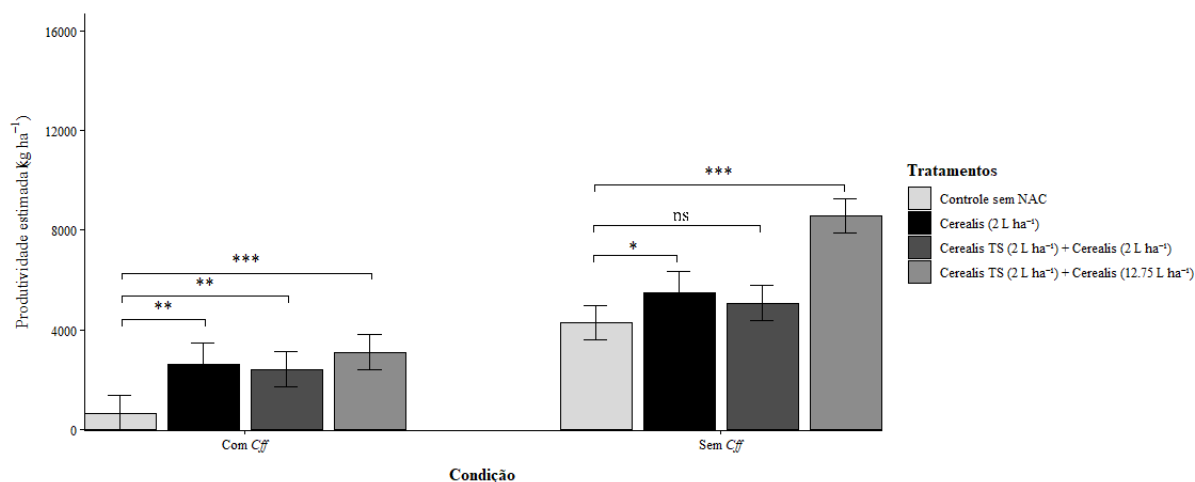
**Figura 22.** Peso de 1000 sementes de qualidade comercial de feijão provenientes de plantas submetidas a diferentes tratamentos com NAC, com e sem *Cff*, em experimento de campo. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Em cada condição, são apresentados o controle sem NAC e os tratamentos com NAC

#### 4.5.4 Produção final estimada

A produtividade final estimada foi calculada com base na produção expressa em kg ha<sup>-1</sup>, a partir da produção obtida em cada parcela, extrapolada para a área equivalente a um hectare. Observou-se que a produtividade foi influenciada pelos tratamentos com NAC. Na condição com *Cff* (**Figura 23**), todos os tratamentos com NAC promoveram aumento significativo em relação ao controle. A maior dose de NAC foi quem apresentou o maior potencial produtivo, diferindo estatisticamente dos demais.

Na condição sem *Cff*, a produtividade foi superior para os tratamentos Cerealis (2 L ha<sup>-1</sup>) e a combinação Cerealis TS (2 L ha<sup>-1</sup>) + Cerealis (12,75 L ha<sup>-1</sup>) em relação ao controle sem NAC.

De maneira geral, os resultados indicam que os tratamentos com NAC promoveram incrementos produtivos, sendo o efeito de maior dose em condição de inoculação por *Cff*, o que demonstra a capacidade do produto em diminuir os efeitos da doença sobre o rendimento da cultura.



**Figura 23.** Produtividade estimada ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) de plantas de feijão submetidas a diferentes tratamentos com NAC, com e sem *Cff*, em experimento de campo. As barras representam as médias e as linhas verticais indicam o erro padrão da média. Os colchetes e asteriscos indicam diferenças significativas dos tratamentos em relação ao controle sem NAC dentro de cada condição (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

No controle sem NAC, a presença do patógeno reduziu drasticamente a produtividade de 4279 para 650  $\text{kg ha}^{-1}$  (Tabela 7). Esse resultado confirma o elevado potencial destrutivo da doença na ausência de qualquer estratégia de manejo.

Para o tratamento Cerealis (2 L  $\text{ha}^{-1}$ ), a produtividade estimada foi de 5486  $\text{kg ha}^{-1}$  na condição sem *Cff* e 2594  $\text{kg ha}^{-1}$  na condição com *Cff*. Já o tratamento Cerealis TS (2 L  $\text{ha}^{-1}$ ) + Cerealis (12,75 L  $\text{ha}^{-1}$ ) apresentou 8584  $\text{kg ha}^{-1}$  sem *Cff* e 3096  $\text{kg ha}^{-1}$  com *Cff*.

Por outro lado, o tratamento Cerealis TS (2 L  $\text{ha}^{-1}$ ) + Cerealis (2 L  $\text{ha}^{-1}$ ) apresentou produtividade de 2410  $\text{kg ha}^{-1}$  na presença do patógeno e 5069  $\text{kg ha}^{-1}$  na ausência, não diferindo estatisticamente do controle dentro da condição sem *Cff*.

**Tabela 7.** Produtividade estimada ( $\text{kg ha}^{-1}$ ), para cada tratamento.

Tratamento	Produtividade estimada ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) – Inoculado	Produtividade estimada ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) – Não inoculado
Controle sem NAC	650 <sup>c</sup>	4279 <sup>c</sup>
Cerealis (2 L $\text{ha}^{-1}$ )	2594 <sup>b</sup>	5486 <sup>b</sup>
Cerealis TS (2 L $\text{ha}^{-1}$ ) + Cerealis (2 L $\text{ha}^{-1}$ )	2410 <sup>b</sup>	5069 <sup>bc</sup>
Cerealis TS (2 L $\text{ha}^{-1}$ ) + Cerealis (12.75 L $\text{ha}^{-1}$ )	3096 <sup>a</sup>	8584 <sup>a</sup>

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ).

A Tabela 7 evidencia que, na condição com *Cff*, todos os tratamentos com NAC apresentaram ganhos expressivos em relação ao controle com *Cff*, variando de 270.7% a 325.5%. Entretanto, na ausência de *Cff*, os ganhos foram mais modestos, variando de 18.4% a

71,4%, reforçando que o principal benefício do NAC ocorreu na mitigação parcial dos efeitos da doença.

De forma geral, a inoculação com a bactéria promoveu redução significativa na germinação (**Figura 18**), no número de sementes peneira 12 (**Figura 19**), no peso de sementes (**Figura 21**) e na produtividade estimada ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) (**Figura 23**). O NAC influenciou algumas variáveis sob condição sem *Cff*, especialmente na combinação Cerealis TS ( $2 \text{ L ha}^{-1}$ ) + Cerealis ( $12,75 \text{ L ha}^{-1}$ ), que apresentou incremento significativo de produtividade em relação ao controle (**Figura 23**)

#### 4.5.5 Atividade de enzimas antioxidantes

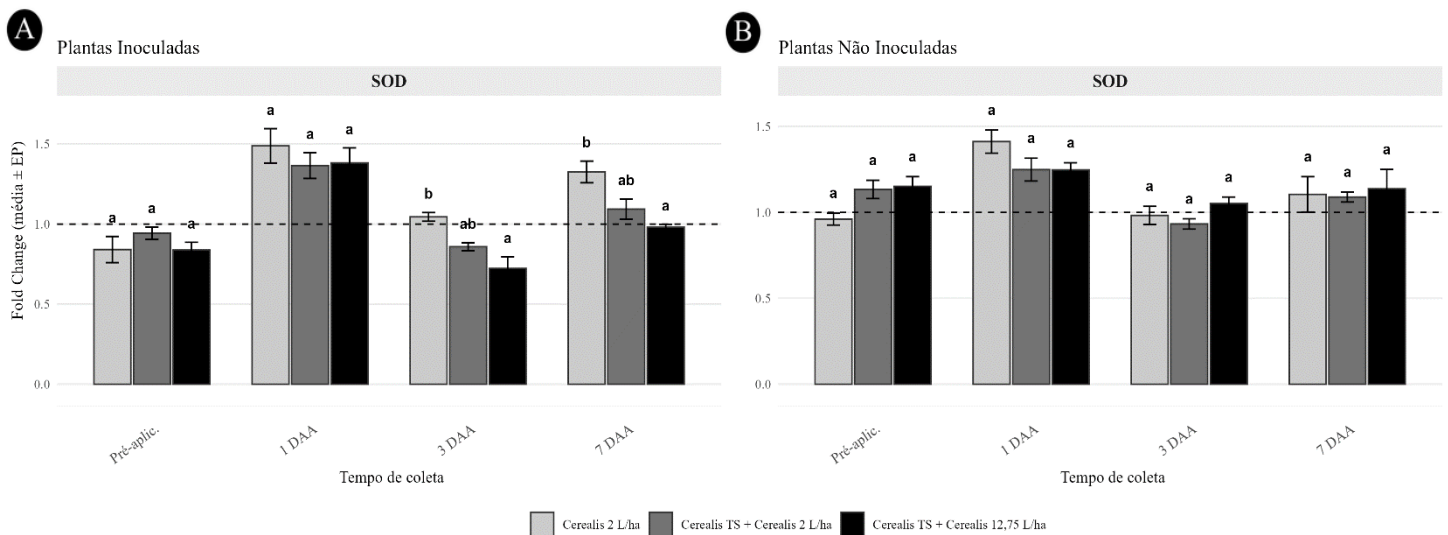
Com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação do NAC sobre o metabolismo antioxidante, foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) nas plantas do experimento em campo, que estavam com ou sem *Cff*.

As coletas foram realizadas aos 0 (pré - aplicação) 1, 3 e 7 dias após a aplicação (DAA) da 3ª dose de Cerealis (via foliar). Para minimizar variações entre parcelas e aplicações, os dados foram analisados como variação em relação ao período de cada aplicação, utilizando modelos mistos para considerar a estrutura de medidas repetidas.

##### 4.5.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD nos tratamentos com NAC foi analisada por meio do fold change em relação ao tratamento controle (sem NAC), considerando separadamente as plantas inoculadas com *Cff* e as plantas saudias, sem inoculação. Para cada tratamento, o fold change foi calculado dividindo-se a atividade enzimática de cada parcela pela média da atividade do controle correspondente (Trat. 4 para o grupo inoculado e Trat. 8 para o grupo não inoculado), no mesmo tempo de coleta. Dessa forma, o valor de referência (fold = 1,0) reflete a atividade basal do controle em cada momento avaliado, eliminando variações temporais decorrentes de fatores ambientais do campo que afetariam igualmente todos os tratamentos. As coletas foram realizadas antes da aplicação do produto (Pré-aplic.) e aos 1, 3 e 7 dias após a aplicação (DAA) na terceira aplicação do produto (45 DAG) (**Figura 24**).

Nas plantas inoculadas com *Cff* (**Figura 24A**), não houve diferença estatística entre os tratamentos na coleta pré-aplicação nem aos 1 DAA ( $p > 0,05$ ), embora todos os tratamentos tenham apresentado fold change superior a 1,0 nesse último período, esse aumento sugere que a aplicação do NAC, independentemente da dose, pode ter induzido resposta antioxidante nas plantas inoculadas. Aos 3 DAA, observou-se diferença significativa entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ): o Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> apresentou a maior redução da atividade (fold  $\approx 0,75$ ), diferindo do Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> (fold  $\approx 1,0$ ), esse declínio da atividade da SOD abaixo do nível do controle pode indicar que, nesse momento, o NAC pode ter atuado diretamente como antioxidante, reduzindo a necessidade de ativação da SOD. Aos 7 DAA, o Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> apresentou fold change superior ( $\approx 1,35$ ), diferindo significativamente do Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> (fold  $\approx 0,97$ ) ( $p < 0,05$ ).

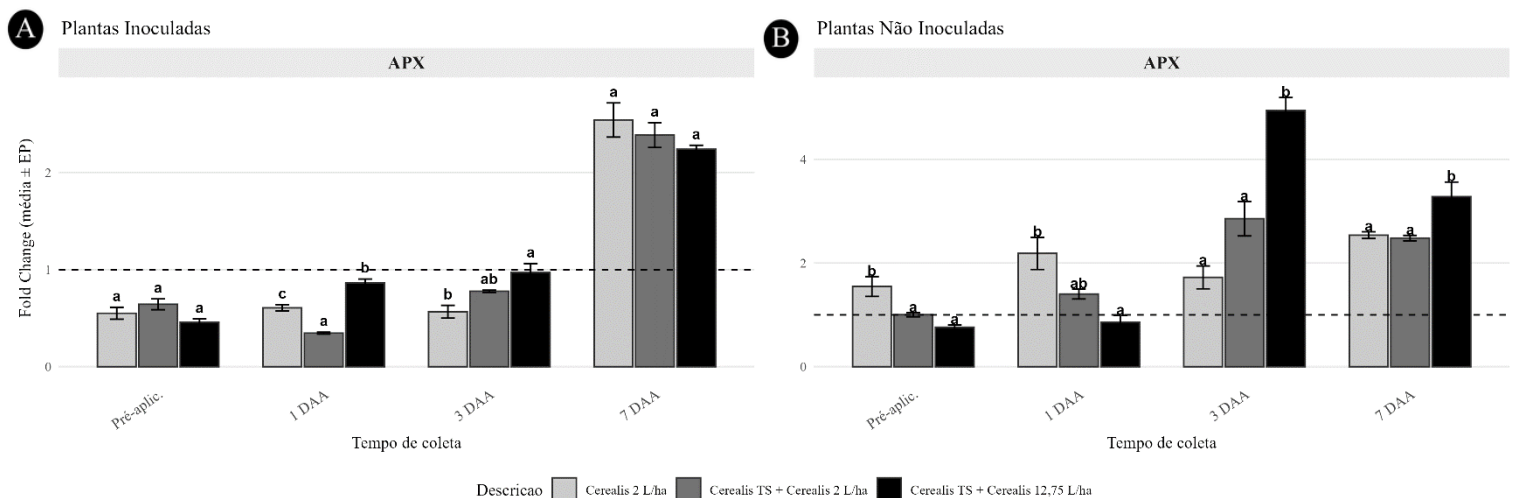


**Figura 24.** Atividade da superóxido dismutase (SOD) na 3ª aplicação (45 DAG), expressa como fold change em relação ao tratamento controle (sem NAC) no mesmo tempo de coleta. (A) Plantas inoculadas com *Cff*. (B) Plantas saudáveis sem *Cff*. As avaliações foram realizadas antes da aplicação (Pré-aplic.) e aos 1, 3 e 7 dias após a aplicação (DAA). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos dentro de cada tempo de coleta pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A linha pontilhada indica o valor de referência do controle (fold = 1,0).

Nas plantas saudáveis, sem inoculação por *Cff* (**Figura 24B**), não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ), com valores próximos a 1,0. Esses resultados indicam que, na ausência do patógeno, a resposta da atividade da SOD foi de menor amplitude quando comparada às plantas inoculadas.

#### 4.5.5.2 Ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX foi expressa como fold change em relação ao controle sem NAC no mesmo tempo de coleta (**Figura 25**). Nas plantas inoculadas com *Cff* (**Figura 25A**), não houve diferença estatística entre os tratamentos na coleta pré-aplicação nem aos 1 DAA ( $p > 0,05$ ), com todos os valores abaixo de 1,0. Aos 1 DAA, o Cerealis TS + Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> apresentou o menor fold change (fold  $\approx 0,4$ ), diferindo dos demais ( $p < 0,05$ ). Aos 3 DAA, o Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> destacou-se com fold  $\approx 1,0$ , diferindo do Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> (fold  $\approx 0,6$ ) ( $p < 0,05$ ). O padrão mais expressivo ocorreu aos 7 DAA, quando todos os tratamentos apresentaram forte aumento da atividade da APX (fold entre 2,3 e 2,7), sem diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ). Esse aumento tardio e generalizado sugere ativação progressiva da APX nas plantas inoculadas tratadas com Cerealis, possivelmente refletindo resposta antioxidante acumulada ao longo do tempo.



**Figura 25.** Atividade da ascorbato peroxidase (APX) na 3ª aplicação (45 DAG), expressa como fold change em relação ao tratamento controle (sem NAC) no mesmo tempo de coleta. (A) Plantas inoculadas com *Cff*. (B) Plantas saudias sem *Cff*. As avaliações foram realizadas antes da aplicação (Pré-aplic.) e aos 1, 3 e 7 dias após a aplicação (DAA). As barras representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos dentro de cada tempo de coleta pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A linha pontilhada indica o valor de referência do controle (fold = 1,0).

Nas plantas saudias, sem inoculação por *Cff* (**Figura 25B**), o padrão foi distinto e com maior amplitude de variação. Na coleta pré-aplicação, o Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> e o Cerealis TS + Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> apresentaram fold  $\approx 1,7$ , diferindo do Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> (fold  $\approx 1,0$ ) ( $p < 0,05$ ). Aos 1 DAA, o Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> apresentou o maior fold change (fold  $\approx 2,2$ ), diferindo dos demais ( $p < 0,05$ ). Aos 3 DAA, o Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> atingiu o maior valor de todo o experimento de APX (fold  $\approx 5,0$ ), diferindo significativamente dos outros tratamentos ( $p < 0,05$ ). Aos 7 DAA, esse mesmo tratamento manteve fold  $\approx 3,2$ , ainda superior

aos demais ( $p < 0,05$ ). O comportamento do Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> nas plantas não inoculadas, com ativação expressiva e sustentada da APX a partir dos 3 DAA, é o resultado mais relevante observado para essa enzima, indicando que a maior dose da formulação foi associada a forte modulação do metabolismo antioxidante mesmo na ausência do patógeno.

A análise conjunta da SOD e da APX revela padrões temporais contrastantes em resposta à aplicação do Cerealis. A SOD apresentou resposta precoce, com aumento do fold change já aos 1 DAA nas plantas inoculadas, seguida de redução transitória aos 3 DAA e comportamento variável aos 7 DAA conforme a dose. A APX, por sua vez, manteve valores abaixo ou próximos a 1,0 nos primeiros dias após a aplicação e exibiu aumento expressivo apenas aos 7 DAA, tanto nas plantas inoculadas quanto, de forma mais expressiva, nas plantas sadias. Esse comportamento sequencial, ativação inicial da SOD seguida de ativação tardia da APX, é coerente com a dinâmica do sistema antioxidante vegetal, no qual a SOD atua na primeira linha de defesa contra o superóxido e a APX na detoxificação subsequente do peróxido de hidrogênio gerado por essa reação.

A comparação entre os grupos inoculado e não inoculado evidencia que a presença de *Cff* modulou o padrão de resposta enzimática de forma distinta para cada enzima. Na SOD, as plantas inoculadas apresentaram maior amplitude de variação ao longo do tempo, com diferenças estatísticas entre tratamentos aos 3 e 7 DAA, enquanto nas plantas sadias a resposta foi discreta e restrita ao 1 DAA. Na APX, o comportamento se inverteu: as plantas não inoculadas exibiram os maiores valores de fold change do experimento, com o Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> atingindo fold  $\approx 5,0$  aos 3 DAA, enquanto nas plantas inoculadas o aumento foi mais gradual e sem diferença entre tratamentos ao final do período. Esse contraste sugere que, nas plantas sob pressão do patógeno, a demanda antioxidante pode estar sendo suprida por outras vias além da APX, ao passo que nas plantas sadias o NAC estimulou preferencialmente essa enzima na dose mais elevada.

Em relação ao efeito de dose, os resultados indicam que as respostas não foram uniformemente dose-dependentes. Na SOD das plantas inoculadas, a menor dose (Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup>) tendeu a apresentar fold change mais elevado aos 7 DAA, enquanto a maior dose (Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup>) foi associada à maior redução da atividade aos 3 DAA. Na APX das plantas não inoculadas, a maior dose foi responsável pelos valores mais expressivos a partir dos 3 DAA. Essa ausência de resposta linear à dose reforça que o NAC, como modulador do estado redox, pode exercer efeitos distintos sobre diferentes enzimas antioxidantes conforme a concentração aplicada e o contexto fisiológico da planta.

## 5. DISCUSSÃO

A murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) representa um desafio crescente para a produção de feijoeiro, especialmente devido ao seu caráter sistêmico, transmissão via sementes e capacidade de persistência endofítica (Tokmakova et al., 2024). Os dados obtidos neste capítulo mostram que o uso de diferentes concentrações de inóculo, métodos de inoculação, formas de aplicação do N-acetilcisteína (NAC) e condições de campo permitiu construir uma visão integrada da interação *Cff*-feijoeiro e do potencial do NAC como ferramenta de manejo.

A escolha da concentração de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> como inóculo padrão foi sustentada pela relação dose-resposta observada, em que concentrações mais baixas não produziram sintomas e concentrações mais altas levaram a murcha severa ou morte precoce das plantas. Em patossistemas vasculares, a concentração do patógeno é um fator determinante para o estabelecimento sistêmico (Chen et al., 2021), uma vez que concentrações elevadas favorecem rápida multiplicação, formação de agregados celulares e intensificação da obstrução vascular. O fato de a concentração intermediária promover sintomas progressivos, sem morte precoce das plantas, é compatível com a necessidade de um equilíbrio entre concentração de inóculo suficiente para gerar doença e preservação do ciclo fenológico para avaliação de parâmetros produtivos.

A eficiência do método de inoculação por perfuração com agulha reforça o papel do xilema como papel central da interação patógeno-hospedeiro. A introdução direta no tecido vascular elimina barreiras externas e acelera o estabelecimento sistêmico, resultando em maiores valores de AUDPC (**Figura 8B**). Embora os métodos via solo e submersão tenham confirmado colonização por PCR (**Figura 7**), a menor severidade visual sugere que *Cff* pode estabelecer-se de forma lenta antes da manifestação sintomatológica depois de alguns dias. Esse comportamento já foi descrito para *Cff* em sistemas agrícolas diversos, o que reforça seu potencial de reemergência (Nascimento et al., 2021).

Além da avaliação da severidade da doença, os efeitos das diferentes formas de inoculação também foram refletidos nos componentes de produção de sementes. A redução no número de vagens e no número total de sementes por vaso foi observada principalmente no tratamento com inoculação por agulha (**Figura 9**), no qual as plantas inoculadas com *Cff* apresentaram valores significativamente inferiores às plantas sem *Cff*. Nos métodos de inoculação por pulverização, solo e submersão, por outro lado, não foram observadas diferenças

significativas entre plantas com e sem *Cff*, indicando que a menor severidade da doença nesses tratamentos não foi suficiente para comprometer a produção de sementes. Esses resultados indicam que o impacto produtivo da murcha bacteriana está diretamente associado ao grau de colonização vascular e à intensidade da infecção estabelecida na planta.

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) confirmou a presença de agregados bacterianos e material extracelular no interior dos vasos do xilema, compatíveis com a formação de biofilme (**Figura 10**). Esses achados estão de acordo com descrições de estruturas pós-formadas e obstruções vasculares em genótipos de feijoeiro com *Cff*, nas quais há deposição de material na luz dos vasos e alterações na parede celular associadas à colonização sistêmica (Valdo et al., 2022). Em revisões recentes, o biofilme é apontado como componente chave da virulência de *Cff*, contribuindo para adesão, estabilidade da população bacteriana e tolerância a estresses ambientais e a moléculas antimicrobianas (Osdaghi et al., 2020).

Nos ensaios em casa de vegetação com aplicação de NAC, o tratamento Cerealis TS + Cerealis apresentou os menores valores de severidade e de AUDPC em comparação aos demais tratamentos (**Figura 12**). Como todos os tratamentos foram conduzidos com a mesma concentração de NAC, esse resultado indica que a forma de aplicação, combinação de tratamento de semente e aplicações foliares, foi determinante para o desempenho observado.

Os parâmetros produtivos em casa de vegetação reforçam esse padrão. Embora a inoculação com *Cff* tenha reduzido significativamente o número de sementes por planta e o peso total de grãos em comparação às plantas sem *Cff*, o tratamento com NAC via Cerealis (aplicação foliar) manteve valores mais próximos aos do controle com plantas sadias e destacou-se entre os tratamentos com *Cff* (**Figura 13**). Essa diferença pode ser interpretada ao considerar o esquema de aplicação adotado, no tratamento Cerealis TS + Cerealis, o NAC foi inicialmente fornecido via tratamento de sementes, em aplicação única, seguida de pulverizações foliares com concentração reduzida por aplicação (**Tabela 4**), uma vez que parte da molécula foi disponibilizada no estágio inicial de desenvolvimento. Já no tratamento exclusivamente foliar com Cerealis, a dose aplicada por pulverização foi maior, concentrando o fornecimento de NAC na fase aérea e em maiores concentrações nos estádios mais próximos ao florescimento e enchimento de vagens. Assim, os resultados sugerem que a eficiência agrônômica não depende apenas da presença do NAC, mas da sua estratégia de distribuição ao longo do ciclo da cultura (Picchi et al., 2024). A aplicação exclusivamente foliar, com maior concentração nas fases reprodutivas, pode ter garantido maior disponibilidade do NAC em tecidos ativos durante períodos de florescimento, enquanto o fornecimento inicial via semente,

embora potencialmente relevante para o estabelecimento da plântula, pode não ter sido suficiente para sustentar efeito prolongado sob pressão de inóculo.

A interpretação dos dados do NAC em outros patossistemas ajuda a contextualizar esses resultados. Em citros infectados por *Xylella fastidiosa*, a aplicação do NAC reduziu a carga bacteriana e contribuiu para a manutenção do vigor e da produtividade, efeito associado tanto à interferência na formação de biofilme quanto a mudanças em variáveis fisiológicas das plantas (Picchi et al., 2024). O NAC demonstrou alterar a estrutura da matriz extracelular (EPS), ao limitar as bactérias aderidas, o que reforça seu papel como agente antibiofilme (da Silva et al., 2024). Esses trabalhos sugerem que, em patógenos vasculares, parte do efeito do NAC decorre da desorganização de biofilmes e da modificação da matriz extracelular, o que é compatível com a redução de severidade observada nos tratamentos com *Cff*.

No experimento de campo, a inoculação com *Cff* promoveu redução significativa na germinação (**Figura 18**), no número de sementes de peneira 12 (**Figura 19**), no peso de sementes e na produtividade estimada ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) (**Figura 21 e 23**). A análise da relação entre população final de plantas e produtividade (**Figura 18B**) indicou tendência positiva em ambas as condições avaliadas, com clara separação entre parcelas inoculadas e não inoculadas: as parcelas não inoculadas concentraram-se consistentemente em faixas superiores de população e produtividade, enquanto as inoculadas apresentaram valores inferiores nessas duas variáveis. Embora essa associação não tenha sido estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), a tendência observada sugere que parte da redução produtiva está relacionada à diminuição do estande, indicando que o impacto da doença não se limitou ao metabolismo das plantas estabelecidas, mas comprometeu também o estabelecimento inicial da cultura.

Na ausência de NAC, a presença do patógeno reduziu a produtividade estimada de 4279 para  $650 \text{ kg ha}^{-1}$  (**Tabela 7**), o que mostrou o efeito da murcha bacteriana quando nenhuma estratégia de manejo é aplicada. Em contraste, para todos os tratamentos contendo NAC, foi observado o aumento expressivo de produtividade em relação ao controle inoculado, com valores estimados variando entre 2410 e  $3096 \text{ kg ha}^{-1}$ . Esses resultados indicam que a aplicação do NAC contribuiu para diminuir parte das perdas produtivas associadas à infecção.

De maneira geral, para os tratamentos com NAC apresentou-se modificação no padrão de resposta produtiva das plantas. Destaca-se a combinação Cerealis TS + Cerealis ( $12,75 \text{ L ha}^{-1}$ ), que apresentou os maiores valores de produtividade tanto na presença do patógeno ( $3096 \text{ kg ha}^{-1}$ ) quanto na sua ausência ( $8584 \text{ kg ha}^{-1}$ ), sugerindo que o NAC pode contribuir tanto para a

redução parcial das perdas causadas pela doença quanto para o desempenho produtivo das plantas em condições sem estresse biótico.

A análise da atividade das enzimas antioxidantes na terceira aplicação (45 dias após germinação - DAG) revelou padrões consistentes de resposta associados ao uso do NAC. Nesse estágio do desenvolvimento, o feijoeiro se encontra em fase de intensa atividade metabólica e transição para o período reprodutivo, fase na qual oscilações no metabolismo oxidativo são comuns devido ao aumento da taxa fotossintética, respiração e redistribuição de assimilados (Cannea & Padiglia, 2025). Nessas condições, o equilíbrio entre produção e remoção de espécies reativas de oxigênio (ROS) torna-se um componente central da homeostase celular (Zheng et al., 2025).

Nas plantas não inoculadas, a atividade da SOD apresentou resposta transitória ao Cerealis, com diferença estatística entre os tratamentos restrita ao período de 1 DAA ( $p < 0,05$ ), quando o Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> exibiu o maior fold change ( $\approx 1,4$ ) em relação ao controle sem NAC (**Figura 24B**). Nos demais tempos de coleta, os valores permaneceram próximos a 1,0 e sem diferença significativa entre tratamentos ( $p > 0,05$ ). Esse comportamento indica que, mesmo na ausência do patógeno, a aplicação do Cerealis foi capaz de estimular transitoriamente a atividade da SOD, compatível com possível modulação do estado redox pelas plantas tratadas (Sakamoto & Suzuki, 2024). Esse tipo de resposta é consistente com o papel fisiológico das ROS como moléculas sinalizadoras em processos normais de crescimento e desenvolvimento, nos quais concentrações moderadas dessas espécies participam da regulação de vias metabólicas e da expressão de genes associados à defesa e ao metabolismo celular (Sood, 2025; Rao et al., 2025).

Nas plantas inoculadas com *Cff*, a atividade da APX apresentou aumento expressivo e generalizado aos 7 DAA, com todos os tratamentos exibindo fold change entre 2,3 e 2,7 em relação ao controle inoculado sem NAC, sem diferença estatística entre si ( $p > 0,05$ ) (**Figura 25A**). Nos períodos anteriores, a atividade permaneceu abaixo de 1,0, com diferença estatística apenas aos 1 DAA, quando o Cerealis TS + Cerealis 2 L ha<sup>-1</sup> apresentou o menor fold change ( $p < 0,05$ ). O padrão sequencial observado (variações moderadas da SOD nos primeiros dias seguidas de aumento da APX) é coerente com o funcionamento do sistema antioxidante vegetal, no qual a SOD converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto a APX participa da detoxificação desse H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por meio do ciclo ascorbato-glutationa (Cannea & Padiglia, 2025).

Em patossistemas vegetais, a infecção por patógenos frequentemente induz a chamada “explosão oxidativa”, caracterizada por rápida produção de ROS após o reconhecimento do patógeno pela planta. Esse aumento de ROS atua como sinal inicial de defesa, mas também exige ativação coordenada do sistema antioxidante para evitar danos oxidativos às células hospedeiras (Sahu et al., 2022). Nesse contexto, o aumento da APX observado nos períodos posteriores sugere ajuste do sistema antioxidante das plantas inoculadas, possivelmente relacionado à necessidade de remover o excesso de peróxido de hidrogênio gerado durante a resposta de defesa.

Esse aumento do sistema antioxidante nas fases mais tardias do experimento indica que aplicações sucessivas de NAC ao longo do ciclo podem promover um efeito acumulativo sobre a capacidade antioxidante das plantas. A literatura descreve que compostos contendo grupos tiol, como o NAC, podem atuar tanto na remoção direta de espécies reativas quanto na regulação do metabolismo redox celular por meio da disponibilidade de cisteína e da síntese de glutathione, um dos principais antioxidantes celulares (Santos et al., 2025).

A integração desses resultados com os dados de produtividade sugere que a modulação do metabolismo redox pode ter contribuído para a manutenção parcial do desempenho produtivo observada em alguns tratamentos com NAC. Nas parcelas inoculadas com *Cff*, tratamentos que apresentaram maior atividade antioxidante na fase final do ciclo tenderam a manter maior número de sementes e maior peso de grãos em comparação ao controle inoculado sem NAC. Esse padrão é reforçado pela análise conjunta da SOD e da APX, que evidenciou comportamento sequencial entre as duas enzimas: ativação precoce da SOD seguida de ativação tardia e mais expressiva da APX, especialmente nas plantas inoculadas. Nas plantas não inoculadas, o Cerealis TS + Cerealis 12,75 L ha<sup>-1</sup> induziu os maiores valores de fold change de APX de todo o experimento (fold  $\approx$  5,0 aos 3 DAA), sugerindo que, mesmo na ausência do patógeno, a maior dose da formulação foi capaz de estimular intensamente o sistema antioxidante. Esses resultados indicam que a resposta enzimática ao Cerealis foi modulada tanto pela presença do patógeno quanto pela dose e formulação do produto.

Do ponto de vista da literatura, além de atuar como antioxidante direto na neutralização de espécies reativas, o NAC pode influenciar a dinâmica de ROS ao modificar o balanço entre produção e eliminação dessas moléculas, o que repercute na regulação de enzimas antioxidantes e na manutenção da homeostase redox em células vegetais (Zheng et al., 2025). Nos estudos com NAC sob infecção por *X. fastidiosa* indicam ajustes em parâmetros relacionados ao

equilíbrio oxidativo e à condição nutricional, estão associados a melhorias em crescimento e produção de frutos (Picchi et al., 2024).

Em conjunto, os resultados de casa de vegetação e de campo sugerem que o NAC pode ser utilizado como uma ferramenta complementar, com efeitos dependentes da forma de aplicação e da formulação. Em casa de vegetação, a combinação Cerealis TS + Cerealis reduziu a severidade da doença e, em experimento separado, o NAC via Cerealis contribuiu para a manutenção do número de sementes e do peso de grãos em plantas inoculadas. Em campo, a inoculação com *Cff* causou perdas de germinação e produtividade, e o NAC mostrou capacidade de reduzir o efeito do inóculo, com evidências de ganhos produtivos comparado com parcelas não tratadas. Esses achados reforçam que o uso do NAC deve ser integrado a outras estratégias de manejo, como uso de sementes saudáveis, rotação de culturas e manejo adequado de restos culturais e plantas hospedeiras alternativas, práticas ainda consideradas a base do controle da murcha bacteriana em sistemas comerciais (Valentini et al., 2010; Osdaghi et al., 2020; Tokmakova et al., 2024). Assim, o conjunto das evidências apresentadas neste capítulo contribui para consolidar o entendimento da interação *Cff*-feijoeiro e posiciona o NAC como uma ferramenta inovadora, no contexto do manejo sustentável da doença.

## CONCLUSÃO GERAL

A murcha bacteriana do feijoeiro causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*Cff*) constitui um importante desafio fitossanitário, especialmente devido ao seu caráter vascular, transmissão via sementes e capacidade de formação de biofilme, fatores que favorecem a persistência do patógeno e dificultam estratégias de controle convencionais. Nesse contexto, os resultados desta dissertação contribuíram para ampliar o conhecimento sobre a biologia do patógeno e para avaliar o potencial do N-acetilcisteína (NAC) como ferramenta complementar no manejo da doença.

Os estudos conduzidos *in vitro* demonstraram que o NAC possui efeito inibitório significativo sobre o crescimento de *Cff*, além de apresentar atividade bactericida e capacidade de desestruturar a formação de biofilme em superfícies abióticas. A caracterização da curva de crescimento bacteriano e da dinâmica de formação de biofilme permitiu estabelecer parâmetros experimentais importantes para estudos futuros envolvendo esse patógeno Gram-positivo, ainda pouco explorado sob essa perspectiva. A redução da formação de biofilme observada na

presença do NAC reforça o potencial de interferir em um dos principais mecanismos associados à persistência e à virulência da *Cff*.

Nos experimentos conduzidos em plantas, foi possível definir condições adequadas de concentração de inóculo e método de inoculação capazes de induzir sintomas consistentes da doença. A confirmação da presença de agregados bacterianos compatíveis com biofilme em vasos do xilema reforça o papel desse processo na colonização vascular e na manifestação dos sintomas de murcha.

A aplicação de produtos à base de NAC influenciou a manifestação da doença em condições de casa de vegetação, com redução da área abaixo da curva de progresso da doença em determinados tratamentos. Entre as estratégias avaliadas, destacou-se a combinação entre tratamento de sementes e aplicações foliares, que apresentou desempenho superior na redução dos sintomas. Esses resultados indicam que a forma de aplicação e o momento de disponibilização do NAC ao longo do ciclo da cultura são fatores determinantes para a eficiência do NAC.

Em condições de campo, a presença de *Cff* resultou em redução significativa da produtividade e da qualidade fisiológica das sementes, evidenciando o impacto agrônômico da doença em sistemas de produção. Os tratamentos contendo o NAC apresentaram aumento de produtividade em comparação ao controle com *Cff* não tratado, indicando que sua aplicação pode contribuir para a diminuição parcial das perdas associadas à murcha bacteriana.

De forma integrada, os resultados obtidos demonstram que o NAC apresenta potencial como componente de estratégias complementares de manejo da murcha bacteriana do feijoeiro, atuando tanto na redução do crescimento bacteriano e da formação de biofilme quanto na modulação da manifestação da doença em plantas. Entretanto, sua eficiência depende da estratégia de aplicação adotada.

Assim, esta dissertação contribui para o avanço do conhecimento sobre a interação entre *Cff* e o feijoeiro e fornece evidências experimentais do potencial do NAC como ferramenta promissora para o manejo sustentável da murcha bacteriana em sistemas de produção de feijão.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALDINI, G. et al. N-Acetylcysteine as an antioxidant and disulphide breaking agent: the reasons why. *Free Radical Research*, v. 52, p. 751–762, 2018. <https://doi.org/10.1080/10715762.2018.1468564>
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, v. 104, n. 2, p. 280–292, 1998. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1040217. x.

- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- CANNEA, Faustina Barbara; PADIGLIA, Alessandra. Antioxidant defense systems in plants: mechanisms, regulation, and biotechnological strategies for enhanced oxidative stress tolerance. *Life*, Basel, v. 15, n. 8, p. 1293, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/life15081293>.
- CARBONELL, S. A. M. et al. IAC 2051: common bean cultivar of carioca type with slow seed coat darkening. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 21, n. 2, 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/1984-70332021v21n2c37>
- CARBONELL, Sérgio Augusto Morais; BUENO, César Junior; FREITAS, Rogério Soares de; WUSTRO, Isabelle Cavagnoli; TICELLI, Marcelo; CHIORATO, Alisson Fernando. IAC 2560 Nelore: resistance to *Colletotrichum lindemuthianum*, with slow seed coat darkening. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 25, n. 4, e53172541, 2025. DOI: 10.1590/1984-70332025v25n4c46.
- CAREZZANO, María Evangelina et al. Biofilm-forming ability of phytopathogenic bacteria: a review of its involvement in plant stress. *Plants*, Basel, v. 12, n. 11, p. 2207, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12112207>.
- CHAURASIA, Sandeep Kumar; ACHARYA, Chinmayee; PANDEY, Jitendra Kumar. Plant's cellular response to biotic stress: a review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 138, 102718, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2025.102718>
- CHEN, G. et al. Complete genome sequencing provides novel insight into the virulence repertoires and phylogenetic position of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *Phytopathology*, 111(2), 268–280, 2021. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0243-R>
- DA SILVA, A. M. et al. N-acetylcysteine effects on extracellular polymeric substances of *Xylella fastidiosa*: a spatiotemporal investigation with implications for biofilm disruption. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 64, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2024.107340>
- DOS SANTOS, L. N. et al. N-Acetylcysteine in agriculture: new insights into its effects for sustainable crop management. *PhytoFrontiers*, v. 5, n. 1, p. 5–16, 2025. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-10-24-0115-RVW>
- EROSHENKO, D.; POLYUDOVA, T.; KOROBOV, V. N-acetylcysteine inhibits growth, adhesion and biofilm formation of Gram-positive skin pathogens. *Microbial Pathogenesis*, v. 105, p. 145–152, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.030>
- EVSEEV, P. et al. *Curtobacterium* spp. and *Curtobacterium flaccumfaciens*: phylogeny, genomics-based taxonomy, pathogenicity, and diagnostics. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 44, p. 889–927, 2022. <https://doi.org/10.3390/cimb44020060>
- FERREIRA, A. L.; WANDER, A. E.; PINHEIRO, P. V. IPM adoption in common beans in Brazil. *Horticulturae*, v. 11, n. 6, 2025. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11060611>
- FERREIRA, S. R. et al. Cross-inoculation and host responses to *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in common bean, soybean, and cowpea. *European Journal of Plant Pathology*, 2025. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-8231906/v1>
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, v. 59, n. 2, p. 309–314, 1977. DOI: 10.1104/pp.59.2.309.
- GOMES-JUNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. *Chemosphere*, v. 65, n. 8, p. 1330–1337, 2006. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.04.056.
- HARDING, M. W. et al. Bactericidal efficacy of oxidized silver against biofilms formed by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *The Plant Pathology Journal*, v. 38, n. 4, p. 334–344, 2022. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2022.0055>
- HARVESON, R. M.; VIDAVER, A. K. A new color variant of the dry bean bacterial wilt pathogen *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* found in western Nebraska. *Plant Health Progress*, v. 9, n. 1, 2008. <https://doi.org/10.1094/PHP-2008-0815-01-BR>
- JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, v. 81, p. 7–11, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- JANISSEN, R. et al. Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Scientific Reports*, v. 5, 9856, 2015. <https://doi.org/10.1038/srep09856>
- LIU, Cheng; LIU, Qingcai; MOU, Zhonglin. Redox signaling and oxidative stress in systemic acquired resistance. *Journal of Experimental Botany*, v. 75, n. 15, p. 4535–4548, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erae193>.
- KARAVIDAS, I. et al. Agronomic practices to increase the yield and quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a systematic review. *Agronomy*, 2022. <https://doi.org/10.3390/agronomy12020271>
- KIZHEVA, Y. et al. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* in Bulgaria. *Pathogens*, v. 13, n. 6, 2024. <https://doi.org/10.3390/pathogens13060483>
- LOVATO, F. et al. Composição centesimal e conteúdo mineral de diferentes cultivares de feijão biofortificado (*Phaseolus vulgaris* L.). *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 21, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.6817>

- MALAMUD, Florencia et al. The *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* flagellum is required for mature biofilm and canker development. *Microbiology*, London, v. 157, p. 819–829, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.044255-0>.
- MURANAKA, L. S. et al. N-Acetylcysteine in agriculture, a novel use for an old molecule: focus on controlling the plant-pathogen *Xylella fastidiosa*. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072937>
- NASCIMENTO, D. M. et al. Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the phyllosphere and rhizosphere of crops. *European Journal of Plant Pathology*, v. 160, n. 1, p. 161–172, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02232-9>
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.
- NISA, Q. et al. Northwestern Himalayan common beans: a treasure trove for breeding resistant bean cultivars for multiple foliar pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 134, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102466>
- OSDAGHI, E.; YOUNG, A. J.; HARVESON, R. M. Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: a new threat from an old enemy. *Molecular Plant Pathology*, v. 21, n. 5, p. 605–621, 2020. <https://doi.org/10.1111/mpp.12926>
- O'LEARY, M. L.; GILBERTSON, R. L. Complete genome sequence resource of a strain of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* from Turkey. *Phytopathology*, v. 110, n. 12, p. 2010–2013, 2020. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0136-A>
- PAZARCI, Özge et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of N-acetylcysteine against *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, Basel, v. 13, n. 2, p. 145, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020145>.
- PETKOVA, T. et al. Effect of N-acetyl-L-cysteine on activity of doxycycline against biofilm-forming bacterial strains. *Antibiotics*, v. 12, n. 7, 2023. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12071187>
- PICCHI, S. C. et al. GC-TOF/MS-based metabolomics analysis to investigate the changes driven by N-acetylcysteine in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Scientific Reports*, v. 11, 22142, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95113-4>
- PICCHI, S. C. et al. N-acetylcysteine absorption and its potential dual effect improve fitness and fruit yield in *Xylella fastidiosa*-infected plants. *Pest Management Science*, v. 80, n. 9, p. 4333–4343, 2024. <https://doi.org/10.1002/ps.8137>
- PICCHI, S. C. et al. N-acetylcysteine interferes with the biofilm formation, motility and epiphytic behaviour of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Pathology*, v. 65, n. 4, p. 561–569, 2016. <https://doi.org/10.1111/ppa.12430>
- PUIA, J. D. et al. Occurrence of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in the state of Paraná and its pathogenicity in beans. *European Journal of Plant Pathology*, v. 159, n. 3, p. 627–636, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02193-5>
- QIAO, K. et al. Evaluation of N-acetylcysteine for the management of bacterial spot of tomato. *Plant Disease*, v. 105, p. 108–113, 2021. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-20-0928-RE>
- RAO, M. J. et al. Antioxidant Defense System in Plants Antioxidant Defense System in Plants: Reactive Oxygen Species Production, Signaling, and Scavenging During Abiotic Stress-Induced Oxidative Damage. *Horticulturae*, 11(5), 2025. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11050477>
- RODRÍGUEZ-MELCÓN, C. et al. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials in *Listeria monocytogenes*. *Biology*, v. 11, 46, 2022. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>
- ROHDE, M. The Gram-positive bacterial cell wall. *Microbiology Spectrum*, v. 7, 2019. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>
- SAHU, P. K. et al. ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1042936>
- SAKAMOTO, M.; SUZUKI, T. N-Acetylcysteine mitigates oxidative stress induced by transplanting lettuce seedlings. *Agronomy*, 14(9), 2024. <https://doi.org/10.3390/agronomy14092112>
- SARKAR, S. et al. Common bean in a changing world: biogeography, nutrition, and microbiome innovations for future food security. *Trends in Food Science and Technology*, 2026.
- SAUER, K. et al. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, p. 608–620, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- SILVA, Graciele Simoneti da. et al. Genetic control of early grain darkening of carioca common bean. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v. 8, p. 299–304, 2008.
- SOARES, R.M. (2017) *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soybean crop. Documents 389. Londrina, PR: Embrapa Soja, 30 pp. ISSN 2176-2937.
- SOOD, M. Reactive oxygen species (ROS): plant perspectives on oxidative signalling and biotic stress response. *Discover Plants*, 2(1), 2025. <https://doi.org/10.1007/s44372-025-00275-4>
- STEWART, P. S. et al. Conceptual model of biofilm antibiotic tolerance that integrates diffusion, metabolism, gene expression, and physiology. *Journal of Bacteriology*, v. 201, n. 22, 2019.

- TANG, M.; FENG, X. Bean common mosaic disease: etiology, resistance resource, and future prospects. *Agronomy*, 2023. <https://doi.org/10.3390/agronomy13010058>
- TARAKANOV, R. et al. Development of a multiplex real-time PCR method for detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in soybean seeds. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, 2023. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.275505>
- THOMAS, P. et al. Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS). *Biotechnology Reports*, v. 8, p. 45–55, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>
- TOKMAKOVA, A. D. et al. Phytopathogenic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains circulating on leguminous plants, alternative hosts and weeds in Russia. *Plants*, v. 13, n. 5, 2024. <https://doi.org/10.3390/plants13050667>
- TÜFEKÇİ, Ebru Derelli; TELİOĞLU, Bayram; AYGÖREN, Ahmed Sidar; YAPRAK, Esra; İLHAN, Emre. Genome-wide characterization of *ascorbate peroxidase* (APX) gene family in *Phaseolus vulgaris* L. in response to multiple abiotic stresses. *South African Journal of Botany*, v. 177, p. 429–444, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.12.030>
- UEBERSAX, M. A. et al. Dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as a vital component of sustainable agriculture and food security: a review. *Legume Science*, 2023. <https://doi.org/10.1002/leg3.155>
- VALDO, S. C. D. et al. Evidence of post-formed structures during systemic *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* infection in resistant *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Colloquium Agrariae*, v. 18, n. 4, p. 12–20, 2023. <https://doi.org/10.5747/ca.2022.v18.n4.a503>
- VALENTINI, G. et al. *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: etiology, detection, and control measures.. *Biotemas*, p. 1–8, 2010. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n4p1>
- VASQUEZ, Y. M. S. C. et al. Genomics, proteomics and antifungal activity of chitinase from *Curtobacterium* sp. CBMAI 2942. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, 9250, 2024. <https://doi.org/10.3390/ijms25179250>
- VENNEMAN, J. et al. First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* infecting common bean in Belgium. *New Disease Reports*, 52(1), 2025. <https://doi.org/10.1002/ndr2.70050>
- ZHENG, Chao; CHEN, Jian-Ping; WANG, Xiao-Wei; LI, Ping. Reactive oxygen species in plants: metabolism, signaling, and oxidative modifications. *Antioxidants*, Basel, v. 14, n. 6, p. 617, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox14060617>.
- ZIA, B. et al. Genome-wide association study and genomic prediction for bacterial wilt resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*) core collection. *Frontiers in Genetics*, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.853114>