



MOYSA CARVALHO GODINHO

**BIOCONTROLE DA MANCHA E MURCHA BACTERIANA
DO TOMATEIRO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**

**LAVRAS - MG
2018**

MOYSA CARVALHO GODINHO

**BIOCONTROLE DA MANCHA E MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO POR
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, na área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

**LAVRAS - MG
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Godinho, Moysa Carvalho.

Biocontrole da mancha e murcha bacteriana do tomateiro por
bactérias endofíticas / Moysa Carvalho Godinho. - 2018.

49 p.

Orientador(a): Ricardo Magela de Souza.

.
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. complexo Xanthomonas. 2. Ralstonia solanacearum. 3.
bactérias endofíticas. I. Souza, Ricardo Magela de. . II. Título.

MOYSA CARVALHO GODINHO

**BIOCONTROLE DA MANCHA E MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO POR
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS**

**BIOCONTROL OF BACTERIAL SPOT AND WILT OF TOMATO BY
ENDOPHYTIC BACTERIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, na área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de julho de 2018.

Dr. Daniel Henrique Ribeiro

Dra. Flávia Mara Vieira Lelis

Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros

Prof. Dr. Ricardo Magela de Souza
Orientador

**LAVRAS – MG
2018**

*Aos meus amados pais, Enisia e Victor (in memoriam),
e aos meus irmãos Michelle e Marcelo,
Com todo carinho
Dedico!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por mais essa conquista, por me iluminar e dar forças para conseguir concluir essa etapa.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos e pela concessão de recursos financeiros para execução do projeto de pesquisa.

Ao professor Dr. Ricardo Magela de Souza, pela orientação, apoio e ensinamentos durante a realização deste trabalho, que guardarei para sempre.

Ao professor Dr. Flávio H. V. de Medeiros, ao Dr. Daniel Henrique Ribeiro e à Dr^a Flávia Mara V. Lelis, pelos ensinamentos, colaboração nos trabalhos, pela compreensão e valiosas sugestões.

Ao professor Edson Ampélio Pozza, pela colaboração nos trabalhos e ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Ana Maria, Ana Luiza, Aline, Fernanda, Melina, Sandra e Vitória, pela amizade, colaboração nos trabalhos e pela convivência agradável. Agradeço especialmente ao Gabriel pelo apoio e auxílio em todo o desenvolvimento do trabalho e a Bruna pelos ensinamentos, companheirismo, apoio e carinho, que vão estar sempre comigo.

Aos meus amigos Gabrielle e Lucas pela amizade, companheirismo e pela agradável convivência durante o mestrado.

Ao meu pai Víctor (*in memoriam*), que mesmo ausente se faz presente em minha vida, minha mãe, Enisia por todo amor, incentivo e compreensão, imprescindíveis durante o período de realização deste trabalho. Aos meus irmãos Michelle e Marcelo, pelo carinho e apoio, e por me presentarem com os sobrinhos mais amados. Vocês são a razão da minha vida.

Ao meu namorado, Diego, por todo amor a mim dedicado, pela compreensão devido à distância, por me dar forças e incentivo, que foram de total importância.

Às minhas amigas, Andreane, Larissa, Simone e Cibelli, por todos esses anos de amizade, companheirismo e apoio durante essa jornada. E em especial, a Petrisa Lacerda por ter-me acompanhado durante esse período, pelos conselhos e profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Fitopatologia, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, Carlos Roberto e Bruno, por sempre me auxiliarem quando necessitei e pelos ensinamentos transmitidos, e em especial a Adriana, Angélica, Ariane e Luana, pelo carinho e amizade.

A todos os colegas de pós-graduação com os quais eu convivi durante este período, principalmente, àqueles que, de certa forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

As doenças de etiologia bacteriana estão entre os principais fatores que afetam a produtividade da cultura do tomateiro, dentre elas, a mancha (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*) e a murcha (*Ralstonia solanacearum*) bacteriana. O controle dessas bacterioses é dificultado em condições ambientais ideais para o desenvolvimento das doenças, através de aplicação de produtos a base de cobre e utilização de variedades resistentes, essas na maioria das vezes, quebrada pelo patógeno. Diante disso, o controle biológico torna-se uma alternativa promissora capaz de reduzir a severidade das doenças. Assim, os objetivos com este trabalho foram avaliar isolados de bactérias endofíticas no controle *in vitro* e *in vivo*, contra as espécies do complexo de *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro. Cinco isolados bacterianos endofíticos selecionados, foram testados para a mancha bacteriana. No teste *in vitro* os isolados UFLA 285, 22 e 07 apresentaram halo de inibição para as espécies de *Xanthomonas* associadas à mancha bacteriana. Nos ensaios de casa de vegetação, os isolados analisados tiveram comportamento frente a cada espécie do complexo *Xanthomonas*. Para *X. euvesicatoria*, os isolados apresentaram redução da severidade em 85,76% e 85%. Para a *X. gardneri*, quatro tratamentos foram mais eficazes, com percentuais de controle correspondentes a 73,10%, 68,55%, 65,13% e 64,97%. Para a espécie *X. perforans*, o isolado mais eficaz foi o UFLA 45, com 62,65% de redução da severidade. Para *X. vesicatoria*, os isolados reduziram a severidade em 82,13%, 65,39% e 63,29%. Para a murcha bacteriana selecionaram-se quinze isolados endofíticos. Quanto ao teste de antagonismo, oito isolados foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *Rs*. Desses isolados, UFLA –22, 285, 50, 51, 40 e 47 foram os mais eficazes, apresentando halos de inibição. Para o experimento em casa de vegetação, avaliaram-se dois métodos de inoculação: imersão das raízes de mudas de tomate da cultivar ‘Santa Clara’ e inoculação via irrigação do solo. O método de imersão foi mais severo, no entanto, os isolados conseguiram controlar a doença em 66,66% e 65,52%, diferindo estatisticamente do tratamento controle (100% de doença). Para o método de irrigação, o isolado UFLA 06 foi o mais eficaz, controlando 65,02% da doença em relação ao controle. Dessa forma, conclui-se que as bactérias endofíticas possuem potencial para o biocontrole sobre o complexo de espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana e sobre a murcha bacteriana, tanto nos testes *in vitro* como nos ensaios em casa de vegetação.

Palavras-chave: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Ralstonia solanacearum*, controle biológico, bactérias endofíticas.

ABSTRACT

The diseases of bacterial etiology are among the main factors that affect tomato productivity, i. e., the bacterial spot (*Xanthomonas vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* and *X. perforans*) and bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). The control of bacteria is difficult in environments ideal for the development of diseases, through the application of copper products and the use of resistant varieties, which are sometimes earlier broken by the pathogen. Therefore, biological control becomes a promising alternative capable of reducing the severity of diseases. The aims of this work were to evaluate the endophytic isolates in the control *in vitro* and *in vivo*, against the species of the complex *Xanthomonas vesicatoria* and *Ralstonia solanacearum*, in tomato. Five isolates of endophytic bacteria were tested for the control of bacterial spot in the *in vitro* test, UFLA 285, 22 and 07. In the greenhouse tests, the results varied depending of each type of *Xanthomonas* complex. *X. euvesicatoria*, decreased the severity by 85.76% and 85%. *X. gardneri*, four isolates was more effective, with control percentages corresponding to 73.10%, 68.55%, 65.13% and 64.97%. *X. perforans*, the most effective isolate was UFLA 45, with a 62.65% severity reduction. *X. vesicatoria*, isolates reduced the severity in 82.13%, 65.39% and 63.29%. Fifteen endophytic isolates were selected for the bacterial wilt. As for the antagonism test, eight isolates was able to inhibit the *in vitro* growth of *R. solanacearum*. Of these, UFLA - 22, 285, 50, 51, 40 and 47 were the most effective. To the in house experiment of vegetation, two methods of inoculation were evaluated: immersion of the roots tomato seedlings 'Santa Clara' cultivar and inoculation via soil irrigation. The method of immersion was more severe, however, the isolates managed to control the disease in 66.66% and 65.52%, differing statistically from the control treatment (100% disease). For the irrigation method, UFLA 06 was the most effective, controlling 65.02% of the disease in relation to the control, concluding that endophytic bacteria have potential for biocontrol over the species belonging to the genus *Xanthomonas*. and bacterial wilt disease both *in vitro* and in greenhouse.

Keywords: *Xanthomonas vesicatoria*, *Xanthomonas euvesicatoria*, *Xanthomonas gardneri*, *Xanthomonas perforans*, *Ralstonia solanacearum*, biological control, endophytic bacteria.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	15
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	17
PRIMEIRO ARTIGO: BIOCONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	17
RESUMO	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1 Obtenção dos isolados bacterianos e preservação	20
2.2 Atividade antagonística <i>in vitro</i> de isolados bacterianos endofíticos ao complexo <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	21
2.3 Atividade <i>in vivo</i> de isolados bacterianos endofíticos ao complexo <i>Xanthomonas</i> <i>vesicatoria</i>	22
2.3.1 Bacterização das sementes de tomate com as bactérias endofíticas	22
2.3.2 Inoculação do complexo <i>Xanthomonas vesicatoria</i> em plantas de tomate	22
2.3.3 Avaliação da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate.....	23
3 RESULTADOS	23
3.1 Atividade antagonista <i>in vitro</i> de isolados bacterianos endofíticos ao complexo <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	23
3.2 Atividade antagonista <i>in vivo</i> de isolados bacterianos endofíticos ao complexo <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	24
4 DISCUSSÃO.....	27
5 CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS	31
SEGUNDO ARTIGO: ISOLADOS BACTERIANOS ENDOFÍTICOS NO BIOCONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO	34
RESUMO	35
1 INTRODUÇÃO.....	36
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1 Obtenção e preservação dos isolados bacterianos	37
2.2 Atividade antagonística <i>in vitro</i> de isolados endofíticos bacterianos à <i>Ralstonia</i> <i>solanacearum</i>	38
2.3 Atividade <i>in vivo</i> de isolados bacterianos endofíticos à <i>Ralstonia solanacearum</i>	39
2.3.1 Preparo das mudas de tomate em casa de vegetação	39

2.3.2 Métodos de inoculação de <i>Ralstonia solanacearum</i> em plantas de tomate.....	39
2.3.3 Inoculação por imersão das raízes das mudas de tomate em suspensão de <i>Ralstonia solanacearum</i>	40
2.3.4 Inoculação por irrigação do substrato com suspensão de <i>Ralstonia solanacearum</i>	40
2.3.5 Avaliação da severidade da murcha bacteriana	40
3 RESULTADOS	41
3.1 Atividade antagonística <i>in vitro</i> de isolados endofíticos bacterianos à <i>Ralstonia solanacearum</i>	41
3.2 Atividade <i>in vivo</i> de isolados bacterianos endofíticos à <i>Ralstonia solanacearum</i>	42
4 DISCUSSÃO	44
5 CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	47

INTRODUÇÃO GERAL

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a segunda hortaliça mais consumida e cultivada no mundo. A produção nacional, estimada em março de 2018, chegou a 4.445,2 mil toneladas. Os principais Estados produtores foram Goiás, São Paulo e Minas Gerais, o qual ocupa o terceiro lugar com 16,8% de participação na produção (AGRICULTURA DO GOVERNO DE MINAS GERAIS, 2018). Entretanto, as doenças e pragas prejudicam a produção de tomates no Brasil, atingindo economicamente os produtores e os consumidores.

Dentre as doenças do tomateiro, a mancha e murcha bacteriana estão entre as principais bacterioses que prejudicam a produtividade da cultura. A mancha bacteriana é causada por um complexo de espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas* (Dowson), a saber, *X. euvesicatoria*, *X. vesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri* (JONES et al., 2004). A doença é sinalizada por manchas de formatos e tamanhos irregulares, com bordos bem definidos nas folhas, podendo ocorrer também nas hastes e nos frutos. Os sintomas iniciais apresentam-se na forma de anasarca, passando de uma coloração amarelada ou verde clara à marrom escura, e com o tempo, as manchas coalescem e necrosam o tecido (GOODE & SASSER, 1980; LOPES & QUEZADO SOARES, 1997). A produção de tomate industrial é a mais atingida pela doença por causa das condições de cultivo, como a irrigação por aspersão ou pivô central, apresentando molhamento foliar alto, o que facilita a penetração e multiplicação das bactérias no campo (QUEZADO-DUVAL, et al., 2003).

As quatro espécies de *Xanthomonas* causadoras da mancha bacteriana do tomateiro são identificadas principalmente por análise genômica (JONES et al., 2005). Os sintomas provocados por essas espécies nas plantas são bem próximos, assim como a morfologia das colônias quando crescidas em placa de Petri contendo meio de cultura. A coloração amarelada devido à produção do pigmento xantomonadina dificulta a identificação visual da espécie que esta lesionando a planta de tomate (BRADBURY, 1986; STALL, 1993).

A murcha bacteriana é causada pela bactéria habitante do solo *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) (YABUUCHI et al., 1995). O sintoma típico da doença é a murcha da planta, ocorrendo inicialmente nas folhas mais velhas, provocada pela fitobactéria ao colonizar os tecidos vasculares. A parede dos vasos apresenta coloração escura devido à produção e oxidação de compostos ocorrendo depósitos de pigmentos escuros. As seções longitudinais do caule das plantas infectadas apresentam um fluxo bacteriano caracterizado

pelo teste de exsudação de pus bacteriano em um copo com água (AGRIOS, 2005; LOPES & ÁVILA, 2005).

Ralstonia solanacearum é a responsável pela principal doença vascular de etiologia bacteriana encontrada no mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, pois infecta várias espécies de plantas pertencentes a mais de 44 famílias botânicas (HAYWARD, 1991). Apresenta grande variabilidade genética; nas subespécies, seus isolados são classificados por meio de um sistema de raças, de acordo com o grupo de espécies hospedeiras, ou de biovars, de acordo com características bioquímicas e nutricionais. A raça 1 no país é constituída por isolados dos biovars I e III os quais foram encontrados infectando o tomateiro no campo (ALVARENGA, et al., 2004).

Existem algumas medidas de controle para essas duas doenças, no entanto, são pouco eficazes e de alto custo para o produtor rural. Constantemente, adota-se o uso de mais de uma medida de manejo da doença, incluindo técnicas de cultivo, cultivares resistentes (no caso específico da murcha bacteriana), uso de produtos químicos à base de cobre, bactericidas e aplicação de antibióticos agrícolas (QUEZADO-DUVAL et al., 2003; CABI, 2013). Ainda assim, os produtos utilizados não oferecem um controle satisfatório da doença, dado que as bactérias possuem uma grande variabilidade genética e conseguem suplantar a resistência das cultivares (QUEZADO-DUVAL et al., 2003).

Além da baixa eficácia dos defensivos químicos, corre-se o risco do surgimento de mutantes com genes de virulência mais agressivos, devido à pressão de seleção de inóculo, ao empregar-se constantemente, o uso do mesmo ingrediente ativo, bem como a contaminação do meio ambiente e o dano à saúde através de aplicações incorretas dos defensivos (QUEZADO-DUVAL et al., 2003). Isto posto, a busca por alternativas que minimizem as quantidades de aplicações de produtos químicos e que sejam menos agressivas ao ambiente e a saúde, tem avançado de forma significativa.

Diante disso, o controle biológico tem sido bem sucedido ao adotar o uso de agentes antagonistas, como isolados endofíticos. Vários são os mecanismos de ação dos agentes desafiadores sobre os fitopatógenos, a saber, antibiose, competição por nicho ecológico, promoção de crescimento, hiperparasitismo e indução de resistência. Assim, bactérias endofíticas estão sendo utilizadas para explorar o biocontrole de doenças em plantas.

Bactérias endofíticas são um grupo de microrganismos que habitam o interior de tecidos saudáveis das plantas, como sementes, raízes, hastes e folhas sem causar nenhum tipo de doença, e demonstram uma simbiose mutualística nas plantas (PURNAWATI, et al., 2014). As plantas se beneficiam da presença dessas bactérias por meio da produção de

compostos, ou metabólitos secundários e antibióticos, que estimulam a produção hormonal, melhorando o crescimento da planta e/ou aumentando a resistência à patógenos (HUNDLEY et al., 2005; BANDARA, et al., 2006).

Corroborando com essas informações, Barreti et al. (2008), demonstraram que bactérias endofíticas são efetivas na promoção de crescimento nas plantas de tomate, além, de apresentarem inibição *in vitro* frente à *R. solanacearum*. Em outro experimento, Barreti et al. (2012), a partir os mesmos isolados bacterianos endofíticos inoculados em quatro variedades de tomate (Caraíbe, Drica, Santa Cruz e Yoshimatsu), foram testados para observação da redução da severidade da murcha bacteriana, o obtendo resultados de controle variando entre 15,6% a 64,9%. Em teste *in vitro* para avaliação de inibição da *Xanthomonas vesicatoria*, ocorreu a presença do halo de inibição de 22 isolados testados, e também, alguns destes isolados endofíticos foram capazes de reduzir a severidade da mancha bacteriana em relação à testemunha (CAMPOS SILVA, 2005).

Exposto esses dados, diferentes mecanismos devem estar envolvidos no controle das doenças por bactérias endofíticas. Estes, porém, podem ser divididos em diretos e indiretos. Quando o estímulo é direto, o controle é promovido pela redução da população de microrganismos patogênicos às plantas, sendo este pelo antagonismo direto ou pela indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997). Quando o estímulo é indireto, o patógeno desafiante produz fitohormônios ou compostos análogos, capazes de estimular o desenvolvimento das plantas (BASHAN & HOLGUIN, 1997).

É de interesse que os agentes antagonistas possam exercer o controle sobre uma ampla gama de fitopatógenos. Além de minimizar o uso de defensivos agrícolas, diminui os custos de produção da cultura, agrega valor no fruto tomate, favorece o meio ambiente e apresenta o menor risco à saúde, logo, possibilitando uma agricultura mais sustentável. Isto posto objetivou-se com o presente trabalho, avaliar isolados de bactérias endofíticas no controle *in vitro* e *in vivo*, contra as espécies do complexo de *Xanthomonas vesicatoria* e *Ralstonia solanacearum*, em tomateiro.

REFERÊNCIAS

- AGRICULTURA DO GOVERNO DE MINAS GERAIS. <http://www.agricultura.mg.gov.br/component/search/?all=tomate&area=all>. Acessado em: 07/06/2018.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. San Diego: Academic, 2005. 922p.
- ALVARENGA, M. A. R. Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia. **Editora UFLA**, 2004.
- BANDARA, W. M. M. S.; SENEVIRANTE, G.; KULASOORIYA, S. A. Interactions among endophytic bacteria and fungi: effects and potentials. **Journal Bioscience**, v. 31, n. 5, p 645-650, 2006.
- BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição *in vitro* de *Ralstonia solanacearum*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 731-739, 2008.
- BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A.; SOUZA, J. T. Combination of endophytic bacteria and resistant cultivars improves control of *Ralstonia* wilt of tomato. **Australasian Plant Pathol**, v. 41, p. 189–195, 2012.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BRADBURY, J. F. **Guide of Plant Pathogenic Bacteria**. Slough: C.A.B. International, 1986. 332 p.
- CABI. **Commenwealth Agriculture and Bioscience**. Invasive Species Compendium *Ralstonia solanacearum*. 2013.
- CAMPOS-SILVA, J. R. Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da Pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro. Lavras: UFLA, 2004. 141 p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Lavras.
- GOODE, M. J.; SASSER, M. Prevention: the key to controlling bacterial speck and bacterial speck of tomato. **Plant Disease**, v. 64, n. 9, p. 831-834, Sept. 1980.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991.
- HUNDLEY, N. J. **Structure elucidation of bioactive compounds isolated from endophytes of *Alstonia scbolaris* and *Acmena graveolens***. Dissertação de mestrado. Universidade de Brigham Young.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology** 27:755-762. 2004.

JONES, J. B.; MOMOL, M. T.; OBRADOVIC, A.; BALOGH, B.; OLSON, S. M. Bacterial spot management on tomatoes. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 1, n. 695, p. 119-123, 2005.

LOPES, C. A.; ÁVILA, A. C. Doenças tomateiro. Brasília. **Embrapa Hortaliças**, 2005.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. **Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA Hortaliças, 1997. 70 p.

PURNAWATI, A.; SASTRAHIDAYAT, I. R.; ABADI, A. L.; HADIASTONO, T. Endophytic bacteria as biocontrol agents of tomato bacterial wilt disease. **The Journal of Tropical Life Science**, v. 4, n. 1, p 33-36, Janeiro, 2014.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p 670-675, outubro-novembro, 2003.

STALL, R. E. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*: cause of bacterial spot of tomato and pepper. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. (Ed.). **Xanthomonas**. London: Chapman & Hall, 1993. p. 57-60.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; YANO, I.; HOTTA, H.; NISHIUCHI, Y. Transfer of two *Burkholderia* and an alcaligenes species to *Ralstonia* Gen. Nov.: Proposal of *Ralstonia pckettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) Comb. Nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Comb. Nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) Comb. Nov. **Microbiol. Immunol.**, v. 39, n. 11, p 897-904, 1995.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

PRIMEIRO ARTIGO: BIOCONTROLE DA MANCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Preparado de acordo com normas de *Tropical Plant Pathology* (Versão preliminar)

Moysa Carvalho Godinho¹, Ricardo Magela de Souza¹, Bruna Canabarro Pozzebon¹, Gabriel Alves Pessoa¹, Fernanda H. S. Souza¹, Ana Maria dos Santos¹, Edson Ampélio Pozza¹.

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brasil

Autor para correspondência: Ricardo Magela de Souza, e-mail: rmagelas@dfp.ufla.br

RESUMO

O tomate está entre as hortaliças mais consumidas mundialmente, entretanto, doenças, em especial as de etiologia bacteriana, prejudicam a sua produtividade. Dentre as bacterioses que afetam a produção de tomates no Brasil, a mancha bacteriana é uma das principais, e está associada a um complexo de espécies pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. Para o controle dessa bacteriose, são utilizadas combinações de práticas de manejo, como por exemplo, a aquisição de sementes e mudas saudáveis, eliminação de plantas voluntárias e doentes da área de plantio e defensivos químicos contendo mancozeb e cobre. No entanto, as fitobactérias são capazes de desenvolver resistência aos produtos químicos, acarretando no manejo inadequado dessas substâncias, aumentando o custo de produção, além de, prejudicar a saúde e contaminar o meio ambiente. Diante disso, como alternativa para minimizar a aplicação dos defensivos agrícolas, está o controle biológico com o emprego de bactérias endofíticas. À vista disso, objetivou-se avaliar o potencial de isolados bacterianos endofíticos do gênero *Bacillus* spp., no controle biológico da mancha bacteriana causada pelo complexo *Xanthomonas*. Cinco isolados endofíticos foram avaliados em testes *in vitro* e *in vivo* em casa de vegetação. No teste de antagonismo, três isolados foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* dos isolados de *Xanthomonas* spp.: UFLA 285, 22 e 07. Nos ensaios de casa de vegetação, os isolados analisados comportaram-se diferente frente a cada espécie do complexo. Para *X. euvesicatoria*, os isolados UFLA 45 e 285 apresentaram controle de 85,76% e 85%, respectivamente. A espécie *X. Gardneri* foi controlada por quatro tratamentos, UFLA 45, 07, 22 e 285, com valores de controle correspondentes a 73,10%, 68,55%, 65,13% e 64,97%, respectivamente. Para a espécie *X. perforans* o isolado mais eficaz foi o UFLA 45 com 62,65% diferindo significativamente dos demais tratamentos. Os isolados UFLA 24, 22 e 07 foram os mais eficazes sobre a *X. vesicatoria* com controle de 82,13%, 65,39% e 63,29%, respectivamente. Dessa forma, conclui-se que as bactérias endofíticas possuem potencial de biocontrole sobre as quatro espécies do gênero *Xanthomonas*, causadoras da mancha bacteriana em tomateiro, em testes *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: *Xanthomonas euvesicatoria*; *Xanthomonas vesicatoria*; *Xanthomonas perforans*; *Xanthomonas gardneri*; controle biológico.

1 INTRODUÇÃO

A produção de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) industrial é a mais prejudicada pela mancha bacteriana. O manejo da irrigação por aspersão ou pivô central, normalmente utilizado nesse sistema, favorece o estabelecimento da doença, pois contribui com um período de molhamento foliar mais prolongado e facilita a penetração da fitobactéria nas folhas da planta de tomate (QUEZADO-DUVAL et al., 2003).

A mancha bacteriana, teve inicialmente *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidger) (BRADBURY, 1986) como agente causador e ao longo de vários estudos genéticos, houve mudanças taxonômicas após o reconhecimento de que se tratava de um grupo diverso, denominado A, B, C e D (JONES et al., 2004).

Jones et al. (2004), baseados em testes com treze fontes de carbono (Dextrina, Glicogênio, N-acetil-D-glucosamina, D-galactose, Gentiobiose, Lactulose α -D-lactose, Ácido acético, Ácido cis-aconítico, Ácido malônico, Ácido propiónico, D-alanina, Ácido glicil-L-aspartico e L-treonina) e hibridização DNA-DNA, reclassificaram as espécies de *Xanthomonas* spp. causadoras da mancha bacteriana em tomate e pimentão em quatro espécies. Os isolados do Grupo A foram classificados como *X. euvesicatoria*, os isolados do Grupo B como *X. vesicatoria*; isolados do Grupo C como *X. perforans* e os isolados do Grupo D como *X. gardneri*. Atualmente, as espécies podem ser identificadas por meio da amplificação de fragmentos genômicos de tamanhos determinados em reação em cadeia da polimerase (reação de PCR, *Polymerase Chain Reaction*) com iniciadores específicos (*primers*), como por exemplo, os desenvolvidos por Koenraadt et al. (2007).

Araújo et al. (2016) ao analisar 204 isolados de *Xanthomonas* associados à mancha bacteriana no Brasil, verificaram que 92% dos isolados pertenciam à espécie *X. perforans*. No entanto, no Estado do Espírito Santo observaram a presença da espécie *X. gardneri* (7,5%). Apenas um isolado foi identificado como *X. euvesicatoria* (0,5%), e nenhum isolado da espécie *X. vesicatoria* foi identificado. De acordo com os autores, não há correlação entre o tipo de tomate (processamento e *in natura*) com as espécies de *Xanthomonas*. Contudo, os autores observaram que os isolados de *X. gardneri* estão concentrados em locais de alta altitude, enquanto os de *X. perforans* estão distribuídos homogeneamente em todo o país. A partir deste fato, a melhor probabilidade está relacionada com a adaptabilidade de *X. gardneri* às temperaturas mais baixas (ARAÚJO et al., 2011; ARAÚJO et al., 2016). Além do mais, estas espécies possuem uma classificação em cinco raças, T1, T2, T3, T4 e T5, que está relacionada com a reação de hipersensibilidade que provocam em hospedeiras diferenciais

(YANG et al., 2005). A raça T1 está associada a *X. euvesicatoria*, a raça T2 a *X. vesicatoria* e *X. gardneri* e as raças T3, T4 e T5 a *X. perforans* (QUEZADO-DUVAL et al, 2004). No Brasil não há relato da raça T5 (QUEZADO-DUVAL & LOPES, 2010).

Por causa das diferentes espécies causadoras da doença, o seu controle é dificultado, e os defensivos agrícolas utilizados não são eficazes em condições favoráveis a doença. Dessa forma, é preciso adotar um conjunto de medidas de manejo como, uso de sementes e mudas saudáveis, rotação de culturas, eliminação de restos culturais da lavoura e plantas voluntárias. As *Xanthomonas* spp. podem sobreviver em associação com a semente, tanto externa, quanto internamente. O risco de transmissão a partir da superfície da semente pode ser reduzido tratando a semente. Atingir as bactérias que se encontram internamente é mais complicado. Tratamentos químicos ou térmicos que conseguem eliminar o patógeno na semente, podem também danificar e comprometer a viabilidade da semente (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1997; MACHADO, 2000).

É sabido que minutos após a embebição da semente, há a liberação de exsudatos que servem como fonte de nutrientes para a flora microbiana associada à semente, ou presente no substrato ao seu redor, estimulando o rápido crescimento e a colonização da semente e da região da espermosfera (SILVA, 2013). Isso posto, o método de bacterização das sementes com bactérias endofíticas torna-se uma alternativa do controle biológico da mancha bacteriana, pela ação da competição por nicho ecológico e nutrientes. Devendo o agente desafiante apresentar características de rápida multiplicação exigindo menos nutrientes que o patógeno e produção de antibióticos com ação imediata.

Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho, avaliar isolados de bactérias endofíticas no controle *in vitro* e *in vivo* das espécies do complexo de *Xanthomonas vesicatoria*, em tomateiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos isolados bacterianos e preservação

As bactérias endofíticas, candidatas a biocontroladoras da mancha bacteriana, foram provenientes da coleção de isolados do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Cinco isolados foram selecionados por apresentar resultados promissores em estudos desenvolvidos por Campos Silva et al. (2008) (isolados UFLA 7, 22, 24 e 45) e Medeiros (2008) (isolado UFLA

285). Todos os isolados obtidos foram preservados em tubos de ensaio com meio 523 inclinado (ROMEIRO, 2001), para o uso contínuo, e em óleo mineral (LELLIOTT & STEAD, 1987), para estoque e preservação das características genéticas (ROMEIRO, 2001). As espécies do complexo *X. vesicatoria* foram cedidos pela Dr^a. Alice Quezado-Duval da Embrapa hortaliças e preservados na coleção de fitobactérias do Laboratório de Bacteriologia Vegetal, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras.

Todos os isolados bacterianos endofíticos, foram descritos como pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo, UFLA 07 *Bacillus megaterium*, UFLA 22 *Bacillus amyloliquefaciens*, UFLA 45 *Bacillus sphaericus* e UFLA 285 *Bacillus subtilis*. No entanto, não há a identificação em nível de espécie do isolado UFLA 24, porém, pertence ao gênero *Bacillus* sp.

2.2 Atividade antagonística *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos ao complexo *Xanthomonas vesicatoria*

Os isolados das bactérias endofíticas foram avaliados no controle do crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*.

A antibiose foi realizada pelo método da dupla camada de meio de cultura, em placas de Petri (60 x 15 mm). Para isso, uma camada básica de meio de cultura sólido 523 foi feita nas placas de Petri. As bactérias endofíticas foram cultivadas em meio 523 líquido, e mantidas sob agitação em Shaker durante 10 h, a 38 rpm e 28 °C. Em seguida, foram repicados em pontos equidistantes 0,5 µL das suspensões de cada isolado candidato a antagonista, por placa de Petri, mais o tratamento controle (água destilada e esterilizada). As placas foram incubadas durante 12 h, a 28 °C para crescimento das colônias bacterianas. Após a incubação, as colônias foram mortas pela exposição a vapores de clorofórmio durante uma hora, seguidas de exposição direta à luz ultravioleta (UV) por mais uma hora (VIDAVER et al., 1972, adaptado).

Concomitantemente, as espécies de *Xanthomonas* foram cultivadas em meio 523 líquido, durante 24 h, a 28 °C, com agitação em Shaker a 38 rpm. Posteriormente, adicionou-se, individualmente, a 5 mL de meio de cultura 523 semi-sólido fundente (45 °C, contendo ágar 0,8%), 0,1 mL de cultura das respectivas espécies fitopatogênicas, previamente cultivadas em meio líquido. Agitou-se os tubos de ensaio suavemente com as mãos, para homogeneização, e finalmente, o meio semi-sólido foi vertido sobre a camada básica contendo as colônias inativas com clorofórmio e luz UV, e incubado a 28 °C, para avaliação

da inibição ou não do crescimento de *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* e *X. gardneri*.

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições para cada isolado das bactérias endofíticas e o controle. Os halos de inibição foram mensurados em centímetros, e os dados analisados no *software* SISVAR (FERREIRA, 2011). As médias submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.3 Atividade *in vivo* de isolados bacterianos endofíticos ao complexo *Xanthomonas vesicatoria*

2.3.1 Bacterização das sementes de tomate com as bactérias endofíticas

Sementes de tomate Santa Clara (susceptível) foram submetidas à desinfestação superficial em álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio 2% (três minutos) seguida de três lavagens em água destilada e esterilizada e posteriormente bacterizadas com suspensões de 10^8 células mL^{-1} ($\text{OD}_{540\text{nm}} = 0,5$) (PINHO et al., 2009) de cada isolado de bactérias endofíticas, por 24 h a 28 ± 5 °C. Para o preparo da suspensão adicionou-se solução salina 0,85% sobre as culturas bacterianas dos isolados endofíticos e realizada uma raspagem com alça de Drigalsky. As sementes desinfestadas foram colocadas em copos plásticos de 50 mL em completa imersão na suspensão bacteriana e agitadas em Shaker a 40 rpm por 24 h. Para o tratamento controle, as sementes foram imersas apenas em solução salina. Decorridas 24 h da bacterização foi realizada a semeadura, na qual quatro sementes foram depositadas em vasos com mistura de solo, areia e esterco na proporção de 1:1:1: (v:v:v) não esterilizado, em casa de vegetação à temperatura de 25 ± 5 °C.

O delineamento experimental foi em blocos casualizados (DBC), com três repetições. Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.3.2 Inoculação do complexo *Xanthomonas vesicatoria* em plantas de tomate

No momento em que as plantas de tomate apresentaram quatro folhas verdadeiras, realizou-se a inoculação das bactérias fitopatogênicas. Câmara úmida foi realizada, para facilitar a penetração do patógeno, 24 horas antes e 24 horas após a inoculação feita por pulverização das suspensões bacterianas diretamente sobre as folhas. Para o preparo das suspensões, as bactérias fitopatogênicas foram crescidas em meio 523 sólido por 48 h a 28 °C e realizada a raspagem do crescimento bacteriano em solução salina 0,85%, com alça de Drigalski. Ajustou-se as suspensões em espectrofotômetro para $\sim 10^8$ células por mL^{-1} ($A_{540\text{nm}} = 0,3$) (CAMPOS SILVA, 2004).

O experimento foi em delineamento de blocos casualizados (DBC) e realizaram-se três repetições para cada isolado do complexo *X. vesicatoria*. Para a análise estatística dos dados obtidos utilizou-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011) e as médias submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$).

2.3.3 Avaliação da severidade da mancha bacteriana em plantas de tomate

As avaliações foram realizadas a partir do 5º dia após a inoculação das bactérias fitopatogênicas, e transcorreram de dois em dois dias, seguindo a escala diagramática proposta por Duan et al., (2015), com modificações.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento experimental blocos casualizados, com três repetições por tratamento, mantendo sempre uma planta por vaso. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se o *software* SISVAR (FERREIRA, 2011). As médias foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0.05$). O experimento foi repetido duas vezes.

3 RESULTADOS

3.1 Atividade antagonista *in vitro* de isolados bacterianos endofíticos ao complexo *Xanthomonas vesicatoria*

Os isolados UFLA 285 e UFLA22 produziram os maiores halos de inibição ao crescimento *in vitro* dos isolados bacterianos do complexo *X. vesicatoria*, diferindo significativamente do controle e dos demais isolados. Para *X. euvesicatoria* o isolado UFLA 285 apresentou halo de inibição de 1,68, sendo superior estatisticamente ao isolado UFLA 22 (Tabela 1).

Os isolados UFLA 07, UFLA 24 e UFLA 45 não apresentaram inibição ao crescimento *in vitro* dos isolados bacterianos *X. vesicatoria*, *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. euvesicatoria*, exceto o isolado UFLA 07 que produziu um halo de 0,6 cm sobre *X. gardneri*, diferindo significativamente do controle (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade antagônica de bactérias endofíticas ao complexo *Xanthomonas vesicatoria*.

Antibiose <i>in vitro</i> (Média do halo de inibição - cm)				
Isolados endofíticos	Complexo <i>Xanthomonas vesicatoria</i>			
	<i>X. euvesicatoria</i>	<i>X. gardneri</i>	<i>X. perforans</i>	<i>X. vesicatoria</i>
UFLA 285	1,68 a*	1,67 a*	1,04 a*	1,56 a*
UFLA 22	1,28 b	1,40 a	1,02 a	1,40 a
UFLA 07	0,00 c	0,60 b	0,00 b	0,00 b
UFLA 24	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b
UFLA 45	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b
Controle	0,00 c	0,00 c	0,00 b	0,00 b

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

3.2 Atividade antagonista *in vivo* de isolados bacterianos endofíticos ao complexo *Xanthomonas vesicatoria*

Na avaliação da severidade em casa de vegetação, para *X. euvesicatoria*, no primeiro ensaio os isolados UFLA 45 e 285 foram os mais eficazes, reduzindo a severidade em 85,76% e 85% respectivamente, quando comparados com o tratamento controle (100% de doença) (Tabela 2). Os isolados UFLA 22, 024 e 07, formaram um segundo grupo que reduziu a severidade da murcha bacteriana, mas de forma menos eficaz que o primeiro. Desses, somente os isolado UFLA 285 e 22 foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de *X. euvesicatoria* (Tabelas 1 e 2). A montagem do segundo ensaio em casa de vegetação, aconteceu nos meses de dezembro e janeiro (2017/2018). Para *X. euvesicatoria*, no segundo ensaio, o isolado mais

eficaz foi UFLA 22 com 72,36% , seguido de UFLA - 285, 07, 24 e 45 na redução da severidade em relação ao controle (100% de doença) (Tabela 2).

Tabela 2: Avaliação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), percentual de controle dos isolados endofíticos sobre a mancha bacteriana causada por *X. euvesicatoria* nos dois ensaios, e avaliação da presença ou ausência do halo de inibição *in vitro* dos isolados endofíticos.

<i>Xanthomonas euvesicatoria</i>					
Isolados	AACPD		% de controle ²		Halo de inibição
	1° ensaio	2° ensaio	1° ensaio	2° ensaio	
UFLA 45	37,13 a ¹	209,07 e	85,76	30,05	-
UFLA 285	39,03 a	111,45 b	85,00	62,71	+
UFLA 24	78,70 b	185,03 d	69,81	38,09	-
UFLA 22	78,73 b	82,60 a	69,80	72,36	+
UFLA 07	116,35 b	144,03 c	55,37	51,81	-
Controle	260,71 c	298,88 f	0,00	0,00	-

(+): Presença do halo de inibição; (-): Ausência do halo de inibição

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

²Em relação à testemunha

Para *X. gardneri*, os isolados UFLA 45, 7, 22 e 285 foram os mais eficazes no controle da doença, com percentuais de redução da severidade de 73,10%, 68,55%, 65,13% e 64,97%, respectivamente (Tabela 3). Destes, os isolados endofíticos UFLA 07, 22 e 285 produziram halo de inibição do crescimento *in vitro* de *Rs* (Tabelas 1 e 3). Para o segundo ensaio, os isolados UFLA – 22, 24 e 45 apresentaram redução na severidade em 59,22%, 56,57 e 45,97%, respectivamente, para *X. gardneri*, diferenciando significativamente dos demais tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3: Avaliação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), percentual de controle dos isolados endofíticos sobre a mancha bacteriana causada por *X. gardneri* e avaliação da presença ou ausência do halo de inibição *in vitro* dos isolados endofíticos.

<i>Xanthomonas gardneri</i>			
Isolados	AACPD	% de controle ²	Halo de inibição

	1° ensaio	2° ensaio	1° ensaio	2° ensaio	
UFLA 45	61,72 a ¹	116,45 a	73,10	45,97	-
UFLA 07	72,10 a	173,55 c	68,55	19,48	+
UFLA 22	79,93 a	87,90 a	65,13	59,22	+
UFLA 285	80,30 a	120,24 b	64,97	44,21	+
UFLA 24	114,90 b	93,60 a	49,88	56,57	-
Controle	229,24 b	215,54 c	0,00	0,00	-

(+): Presença do halo de inibição; (-): Ausência do halo de inibição

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

²Em relação à testemunha

No primeiro ensaio de avaliação do controle da severidade de *X. perforans*, o isolado mais eficaz foi o UFLA 45, com redução de 62,65% da severidade da doença, quando comparado com o tratamento controle (100% de doença) (Tabela 4). Os isolados UFLA 22 e 07 apresentaram controle intermediário entre 50,11 e 45,98 %. No segundo ensaio os isolados, UFLA 24 e 45 diferenciaram dos outros tratamentos, reduzindo a mancha bacteriana em 79,02% e 74,61%, respectivamente (Tabela 4). Os isolados UFLA 285, 07 e 22 formaram um grupo intermediário reduzindo a mancha bacteriana em 58,28, 44,072 e 41,08%, respectivamente.

Tabela 4: Avaliação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), percentual de controle dos isolados endofíticos sobre a mancha bacteriana causada por *X. perforans* e avaliação da presença ou ausência do halo de inibição *in vitro* dos isolados endofíticos.

<i>Xanthomonas perforans</i>					
Isolados	AACPD		% de controle ²		Halo de inibição
	1° ensaio	2° ensaio	1° ensaio	2° ensaio	
UFLA 45	13,29 a ¹	59,12 a	62,65	74,61	-
UFLA 22	17,75 b	137,20 b	50,11	41,08	+
UFLA 07	19,22 b	130,25 b	45,98	44,07	-
UFLA 285	46,90 c	97,15 b	-	58,28	+
UFLA 24	50,38 c	48,85 a	-	79,02	-
Controle	35,58 c	232,87 c	0,00	0,00	-

(+): Presença do halo de inibição; (-): Ausência do halo de inibição

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

²Em relação à testemunha

Para *X. vesicatoria*, no primeiro ensaio os isolados UFLA 24, 22 e 07 apresentaram redução da severidade em relação ao controle de 82,13%, 65,39% e 63,29%, respectivamente, diferenciando significativamente dos demais tratamentos (100% doença). O isolado UFLA 22 inibiu também o crescimento *in vitro* de *X. vesicatoria* (Tabelas 1 e 5). No segundo ensaio os isolados bacterianos UFLA 07, 285, 24, 22 e 45 formaram um único grupo e diferenciaram significativamente do controle, pelo teste estatístico (Tabela 5), apresentando redução da severidade em 66,72%, 61,72%, 59,61%, 59,56% e 55,61%, respectivamente.

Tabela 5: Avaliação da Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), percentual de controle dos isolados endofíticos sobre a mancha bacteriana causada por *X. vesicatoria* e avaliação da presença ou ausência do halo de inibição *in vitro* dos isolados endofíticos.

<i>Xanthomonas vesicatoria</i>					
Isolados	AACPD		% de controle ²		Halo de inibição
	1° ensaio	2° ensaio	1° ensaio	2° ensaio	
UFLA 24	31,55 a ¹	117,30 a	82,13	59,61	-
UFLA 22	61,11 a	117,45 a	65,39	59,56	+
UFLA 07	64,83 a	96,65 a	63,29	66,72	-
UFLA 285	79,23 b	111,17 a	55,13	61,72	+
UFLA 45	95,51 b	128,93 a	45,91	55,61	-
Controle	176,58 b	290,45 b	0,00	0,00	-

(+): Presença do halo de inibição; (-): Ausência do halo de inibição

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

²Em relação à testemunha

4 DISCUSSÃO

Foi possível pelo teste de antibiose verificar que os isolados UFLA 285 e 22 sintetizam compostos antimicrobianos capazes de inibirem o crescimento *in vitro* das espécies pertencentes ao complexo *Xanthomonas*. É sabido que, espécies do gênero *Bacillus* sp. são capazes de produzir bacteriocinas e metabólitos eficientes para suprimir e controlar o crescimento de outros microrganismos. Esse controle ocorre através da produção de diferentes polipeptídeos, que apresentam ação antimicrobiana, como por exemplo, mersacidina,

micosubilitina, iturina, bacilomicina, fengicina, bacilicina e surfactina (STEIN, 2005), assim como por estimuladores de crescimento da planta (TAN et al., 2013).

Os princípios ativos que compõem os produtos registrados no Brasil, para o controle da mancha bacteriana, são fungicidas como mancozeb em associação com cobre, e também antibiótico, como casugamicina. De acordo, com Araújo et al. (2012), há uma significativa variação na sensibilidade ao cobre e à estreptomicina entre as duas espécies mais prevalentes no Brasil, *X. perforans* e *X. gardneri*, variação que também foi registrada para *X. vesicatoria* e *X. euvesicatoria*, concluindo que a divergência de sensibilidade aos compostos antimicrobianos parece estar relacionada com a espécie.

De acordo com as avaliações do primeiro e segundo ensaio em casa de vegetação, observam-se que houve significativas reduções da severidade da mancha bacteriana, para as quatro espécies de *Xanthomonas* em relação ao tratamento controle. Entretanto, os isolados se diferenciaram do primeiro para o segundo ensaio, em relação aos maiores valores de porcentagens de controle. Essas reduções da severidade dos sintomas da mancha bacteriana podem estar relacionado, possivelmente, com o mecanismo de indução de resistência sistêmica, pelos microrganismos endofíticos. Blainski et al. (2017), analisaram exopolissacarídeos (EPS) produzidos por *Lactobacillus plantarum* para induzir resistência contra a mancha bacteriana do tomateiro. Os EPS reduziram os sintomas da mancha bacteriana em 72%, comparando-se ao controle. Porém, não observaram efeitos diretos do EPS no crescimento *in vitro* de *X. gardneri*, sugerindo também a ação de indução de resistência nesse caso. Assim, a capacidade dos EPS em controlar a doença, pode ser devido à habilidade da planta em reconhecer moléculas efetoras de patógenos. Este reconhecimento é devido aos Padrões Moleculares Associados a Microrganismo (MAMPs), responsáveis por ativar a resposta imunológica da planta, e a partir disso as plantas são geneticamente preparadas para reconhecer esses sinais moleculares dos patógenos (ZHANG & ZHOU, 2010).

A partir dos resultados obtidos do primeiro ensaio em casa de vegetação, observa-se uma distinção dos isolados endofíticos que diferenciaram significativamente no controle da doença para cada espécie do complexo. No entanto, o isolado UFLA 45, promoveu a maior porcentagem de controle para três espécies associadas à mancha bacteriana, as quais, *X. euvesicatoria*, *X. gardneri* e *X. perforans*. Apesar deste isolado ter apresentado porcentagem de controle superior aos demais isolados, para as *X. euvesicatoria* e *X. gardneri*, não diferenciou significativamente dos isolados 285 e 07, 22 e 285, respectivamente. Com relação ao segundo ensaio, também houve essa diferença entre os isolados endofíticos frente à

mancha bacteriana. Entre as espécies *X. gardneri*, *X. perforans* e *X. vesicatoria* o isolado UFLA 45 encontrou-se entre os mais eficazes, exceto para *X. euvesicatoria*. Esses resultados sugerem que ocorram diferentes respostas através da interação patógeno-hospedeiro e as condições ambientais.

Além da alta variabilidade genética desse complexo, Araújo et al. (2011), observaram a interação entre temperatura e severidade da mancha bacteriana causada por *X. perforans* e *X. gardneri*, em que a primeira espécie apresentou maior severidade em condições ambientais de 30 °C, e a segunda, maior severidade em condições ambientais de 20 °C. As temperaturas médias registradas nos dias da inoculação do primeiro ensaio foram de 23, 18 e 22,5 °C, nos meses de novembro e dezembro de 2017 (INMET, 2018). Observa-se que *X. perforans* apresentou menor severidade em relação às outras espécies associadas a mancha bacteriana (Tabela 4). Isso pode ter ocorrido por possíveis influências ambientais, como um maior período de molhamento foliar e altas temperaturas, dado que estes fatores favorecem a incidência da doença. Durante a montagem do segundo ensaio, as temperaturas médias nos dias da inoculação foram de 24, 23 e 24 °C, nos meses de dezembro e janeiro de 2017/18 (INMET, 2018), com o aumento da temperatura, observa-se que *X. perforans* (Tabela 8) apresenta maior valor de severidade no tratamento controle, em comparação com a *X. gardneri* (Tabela 7), corroborando com os dados de Araújo et al. (2011), em que há interação entre temperatura e a severidade entre essas espécies.

Complementando os resultados obtidos, diferentes mecanismos estão envolvidos no controle das doenças por bactérias endofíticas, sendo divididos em diretos e indiretos. No caso do estímulo ser indireto, o controle é favorecido por meio da redução da população de fitopatógenos, sendo este pelo antagonismo direto ou pela indução de resistência sistêmica (HALLMANN et al., 1997). Quando o estímulo é direto, o patógeno desafiante produz fitohormônios ou compostos similares, capazes de promover o desenvolvimento das hospedeiras (BASHAN & HOLGUIN, 1997). Dessa forma, no caso específico dos isolados que apresentaram halo de inibição *in vitro* e reduziram a severidade da doença em casa de vegetação, os mecanismos de antagonismo direto e indução de resistência podem estar ocorrendo simultaneamente. Já para os isolados que reduziram a severidade em casa de vegetação e não apresentaram controle no desenvolvimento *in vitro* das espécies fitopatogênicas, o possível mecanismo envolvido foi a indução de resistência sistêmica.

Devido a grande variabilidade genética presente nas espécies causadoras da mancha bacteriana em tomateiro, medidas alternativas para o controle dessa doença devem ser adotadas, visto que, sob as condições do experimento, o biocontrole das bactérias endofíticas

sob a mancha bacteriana apresentou bons desempenhos em comparação ao tratamento controle (solução salina 0,85%). Diante disso, estudos sobre os mecanismos de ação envolvidos nesse controle e mediados por essas bactérias endofíticas, ainda precisam ser melhores explorados, a fim de que novas moléculas com ação bactericida possam ser descobertas, e futuramente, inseridas no mercado de defensivos agrícolas.

5 CONCLUSÃO

Os isolados bacterianos endofíticos UFLA 285, 22 e 07 apresentaram inibição do crescimento *in vitro* das espécies do complexo *Xanthomonas vesicatoria*.

Os isolados bacterianos endofíticos UFLA 285, 22, 45, 24 e 07 promoveram a redução da severidade da mancha bacteriana em tomateiro, sob condições ambientais de casa de vegetação, para todas as espécies do complexo *Xanthomas vesicatoria* associadas à doença.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. R.; PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; CAFÉ-FILHO, A. C.; MOITA, A. W.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Effect of temperature on pathogenicity components of tomato bacterial spot and competition between *Xanthomonas perforans* and *X. gardneri*. **Acta Horticulturae** 914, 39– 42. 2011.
- ARAÚJO, E. R.; PEREIRA, R. C.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M.; CAFÉ-FILHO, A. C. Sensitivity of xanthomonads causing tomato bacterial spot to copper and streptomycin and *in vivo* infra-specific competitive ability in *Xanthomonas perforans* resistant and sensitive to copper. **Journal of Plant Pathology**, 94 (1), 79-87. 2012.
- ARAÚJO, E. R.; COSTA, J. R.; FERREIRA, M. A. S. V.; QUEZADO-DUVAL, A. M. Widespread distribution of *Xanthomonas perforans* and limited presence of *X. gardneri* in Brazil. **Plant Pathology**. 2016.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 103-121, 1997.
- BLAINSKI, J. M. L.; ROCHA NETO, A. C.; LUIZ, C.; ROSSI, M. J.; DI PIERO, R. M. *Lactobacillus plantarum* Exopolysaccharides Induce Resistance against Tomato Bacterial Spot. **Journal of Agricultural Science**; Vol. 9, No. 2; 2017.
- BRADBURY, J. F. **Guide to Plant Pathogenic Bacteria**. CAB International Mycological Institute, p. 332, 1986.
- CAMPOS-SILVA, J. R. Bactérias endofíticas no controle da mancha (*Xanthomonas vesicatoria*) e da Pinta (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) bacterianas do tomateiro. Lavras: UFLA, 2004. 141 p. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal de Lavras.
- CAMPOS-SILVA, J. R. et al. Control with endophytic bacteria and *in vitro* inhibition of *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agent of bacterial speck of tomato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, jul./ago. 2008.
- DUAN, J.; ZHAO, B.; WANG, Y.; YANG, W. Development and validation of a standard area diagram set to aid estimation of bacterial spot severity on tomato leaves. **Eur J Plant Pathol**, v. 142, p. 665–675, 2015.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.
- INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acessado em: 08/02/2018.

JONES, J. B.; LACY, G. H.; BOUZAR, H.; STALL, R. E.; SCHAAD, N. W. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. **Systematic and Applied Microbiology** 27:755-762. 2004.

KADO, C.I. E HESKETT, M.G. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969. 1970.

KOENRAADT, H.; et al. Development of species primers for the molecular detection of bacterial spot of pepper and tomato. In: **II International Symposium on Tomato Diseases** 808, p. 99-102, 2007.

LELLIOTT, R. A. A.; STEAD, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease** 216.1987.

LOPES, C. A.; QUEZADO-SOARES, A. M. Doenças bacterianas das hortaliças: diagnose e controle. Brasília: **EMBRAPA/CNPB**, 1997. 70 p.

MACHADO, J. C. Tratamento de sementes no controle de doenças. Lavras: **UFLA**, 2000. 138p.

MEDEIROS, F. H.; SOUZA, R. M.; FERRO, H. M.; MEDEIROS, F. C.; POMELLA, A. W.; MACHADO, J. C.; SANTOS NETO, H.; SOARES, D. A.; ZANOTTO, E.; PARÉ, P. W. *Bacillus* spp. to manage seed-born *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* damping off. **Phytopathology**. 2008.

PINHO, R. S. C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M.; SILVA, J. R.C.; OLIVEIRA, M. S.; PIMENTEL, G. C. S.; COSTA, L. S.A.S. Efeito de Bactérias Endofíticas no Controle de *Meloidogyne incognita* e sua Capacidade de Colonização de Raízes de Tomateiro. **Nematologia Brasileira Piracicaba** (SP) Brasil, Vol. 33, 2009.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; GAZZOTO FILHO, A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; CAMARGO, L. E. A. Sensibilidade a cobre, estreptomomicina e oxitetraciclina em *Xanthomonas* spp. associadas à mancha bacteriana do tomate para processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p 670-675, outubro-novembro, 2003.

QUEZADO-DUVAL, A. M.; LOPES, C. A.; LEITE JÚNIOR, R. P.; LIMA, M. F.; CAMARGO, L. E. A. Diversity of *Xanthomonas* spp. associated with bacterial spot of processing tomatoes in Brazil. **Acta Horticulturae**, The Hague, n. 695, p. 101-108, 2004.

QUEZADO-DUVAL, A. M., LOPES, C. A. Mancha bacteriana: uma atualização para o Sistema de Produção Integrada de Tomate Indústria. Circular Técnica. **EMBRAPA/Hortaliças** Brasília, p. 24, 2010.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. 1st ed. 279. 2001.

SILVA, D. A. G; CARVALHO, A. O; PEREIRA, M. B; OLIVARES, F. L; CARMO, M. G. F. Transporte de *Xanthomonas vesicatoria* de sementes para plântulas e mudas de tomate. **Horticultura Brasileira** 31: 50-58, 2013.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

TAN, S. et al. The effect of organic acids from tomato root exudates on rhizosphere colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* T-5. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 15-22, 2013.

VIDAVER, A. K., et al. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology**, v, 18, p.705-13, 1972.

YANG, W.; SACKS, E. J.; LEWIS IVEY, M. L.; MILLER, S. A.; FRANCIS, D. M. Resistance. In: *Lycopersicon esculentum* intraspecific crosses to race T1 strains of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* causing bacterial spot of tomato. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 95, n. 5, p. 519-527, 2005.

ZHANG, J.; ZHOU, J. M. Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. **Mol Plant.**, 5, 783-793. 2010.

**SEGUNDO ARTIGO: ISOLADOS BACTERIANOS ENDOFÍTICOS NO
BIOCONTROLE DA MURCHA BACTERIANA DO TOMATEIRO**

Preparado de acordo com normas de *Tropical Plant Pathology* (Versão preliminar)

Moysa Carvalho Godinho¹, Ricardo Magela de Souza¹, Bruna Canabarro Pozzebon¹, Gabriel
Alves Pessoa¹, Fernanda H. S. Souza¹, Ana Maria dos Santos¹, Edson Ampélio Pozza¹.

¹Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, MG,
Brasil

Autor para correspondência: Ricardo Magela de Souza, e-mail: rmagelas@dfp.ufla.br

RESUMO

A murcha bacteriana do tomateiro é causada pela fitobactéria *Ralstonia solanacearum* (*Rs*). O controle da doença é baseado em combinações de práticas de manejo, como por exemplo, plantio em áreas sem histórico do patógeno, uso de sementes e mudas saudáveis, cultivares resistentes e rotação de culturas. Não há produtos químicos registrados para o controle da doença. Nesse contexto o controle biológico, com o uso de bactérias endofíticas, surge como uma alternativa para o controle dessa doença. Diante disso, objetivou-se com este trabalho avaliar o potencial de isolados bacterianos endofíticos dos gêneros *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp. no controle biológico da murcha bacteriana. Quinze isolados endofíticos foram avaliados em teste *in vitro* e em casa de vegetação. Nos testes *in vitro* oito desses isolados apresentaram antagonismo a *Rs* inibindo o seu crescimento. Os isolados UFLA - 22, 285, 50, 51, 40 e 47 foram os mais eficazes, apresentando halos de inibição de 1,56, 1,44, 1,44, 1,24, 1,20 e 1,10 cm respectivamente. Nos experimentos em casa de vegetação, foram avaliados dois métodos de inoculação: imersão das raízes de mudas de tomate da cultivar 'Santa Clara' e irrigação do solo com a suspensão bacteriana. O método de imersão das raízes foi mais severo, no entanto, os isolados UFLA 22 e 37 controlaram a doença em 66,66% e 65,52%, respectivamente, diferindo estatisticamente do tratamento controle (100% de doença). Para o método de irrigação, o isolado UFLA 06 foi o mais eficaz, controlando 65,02% da doença em relação ao controle (100% de doença). Dessa forma, conclui-se que as bactérias endofíticas apresentaram-se eficazes no biocontrole da murcha bacteriana, tanto no teste *in vitro* como no ensaio em casa de vegetação.

Palavras-chave: isolados endofíticos; controle biológico; *Ralstonia solanacearum*.

1 INTRODUÇÃO

A murcha das solanaceas é a principal doença vascular de etiologia bacteriana encontrada mundialmente, particularmente em regiões tropicais e subtropicais, devido às condições favoráveis à doença, como altas temperaturas e alta umidade relativa. A importância da doença está relacionada ao fato do patógeno ser capaz de infectar mais de 200 espécies de plantas, pertencentes a mais de 50 famílias botânicas, incluindo culturas agronomicamente importantes como tomate (*Solanum lycopersicum*), batata (*Solanum tuberosum*), pimentão (*Capsicum annuum*), fumo (*Nicotiana tabacum*), banana (*Musa* spp.), gengibre (*Zingiber officinale*), amendoim (*Arachis hypogaea*) e eucaliptos (*Eucalyptus* spp.) (HAYWARD, 1991; KELMAN, 1953; FRENCH & SEQUEIRA, 1970).

A doença é causada por *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabunchi et al. (1996) (*Rs*), uma espécie heterogênea, evidenciada por sua ampla gama de hospedeiros, especialização patogênica e hospedeira, propriedades fisiológicas, assim como sua filogenia (HAYWARD, 2000). A bactéria é classificada por meio de um sistema de raças, de acordo com o grupo de espécies hospedeiras que ataca, e também pela proposição de biovars, conforme suas características bioquímicas e nutricionais (ALVARENGA et al., 2004).

O patógeno é habitante do solo, e sobrevive por longos períodos no solo, até encontrar um hospedeiro para que possa começar um novo ciclo da doença, quando em condições favoráveis. Diante disso, torna-se difícil o controle da *R. solanacearum*, pois não há produtos químicos registrados, necessitando de adotar vários métodos de controle, como, técnicas de cultivo, tratamento físico, o uso de cultivares resistentes, rotação de culturas, plantio em áreas sem histórico da doença e eliminação de plantas hospedeiras. Apesar da existência destes métodos, o sucesso do controle é limitado (CIAMPI-PANNO et al., 1989), em consequência da variabilidade genética do patógeno, a mesma pode suplantar a resistência das cultivares (HAYWARD, 1991). Além disso, pelo fato da fitobactéria colonizar os feixes vasculares, dificulta-se mais a ação de qualquer método.

Isto posto, o controle biológico pode ser uma alternativa para o controle dessa bacteriose. No controle biológico de doenças, as bactérias endofíticas podem atuar através de diversos mecanismos, entre os quais antibiose, competição e indução de resistência sistêmica. A base da antibiose como técnica do biocontrole esta mais compreendida, através da identificação dos metabólitos produzidos pelas bactérias assim é possível estudar como o composto atua no antagonismo de patógenos (COMPANT, 2005).

Certas bactérias desencadeiam um fenômeno conhecido como indução de resistência sistêmica (IRS) o qual é semelhante à resistência sistêmica adquirida (RSA). A RSA desenvolve-se quando as plantas ativam com êxito o seu mecanismo de defesa em resposta à infecção por um agente patogênico, especialmente quando este último induz uma reação de hipersensibilidade através da qual se torna limitada numa lesão local necrótica de coloração marrom (VAN LOON, 1998; COMPANT, 2005). Como RSA, a IRS é eficaz contra diferentes tipos de agente patogênicos mas difere do RAS em que as bactérias indutoras não provocam sintomas visíveis na planta hospedeira (VAN LOON, 1998). Além disso, as bactérias endofíticas possuem algumas vantagens em relação aos métodos convencionais de controle, pois são protegidas contra flutuações bruscas de temperatura, dessecação, precipitações, radiações solares e competição por nicho, por habitarem o interior do hospedeiro (FRANCIS et al., 2010), podendo competir com *R. solanacearum* por espaço e nutrientes.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho, avaliar o potencial de 15 isolados endofíticos, pertencentes aos gêneros *Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp., quanto ao antagonismo *in vitro*, e ao controle da severidade em casa de vegetação, através de dois métodos de inoculação da *R. solanacearum*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção e preservação dos isolados bacterianos

Os isolados bacterianos endofíticos candidatos ao controle biológico e de *Ralstonia solanacearum* foram provenientes da coleção de isolados do Laboratório de Bacteriologia de Plantas, do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Selecionaram-se 15 isolados para avaliação do potencial de controle da murcha bacteriana (Tabela 1). Estas bactérias endofíticas foram isoladas anteriormente de folhas e hastes de plantas de tomate e de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sadias, preservadas em peptonaglicerol e armazenadas em deep freezer. Os isolados bacterianos endofíticos foram previamente identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp. e *Paenibacillus* sp: *B. amyloliquefaciens* (UFLA 22 e 50), *B. megaterium* (UFLA 07), *B. pumillus* (UFLA 02, 06, 12, 20, 39 e 51), *B. sphaericus* (UFLA 45), *B. subtilis* (UFLA 285), *P. gordonae* (UFLA 40), *P. macerans* (UFLA 37 e 47) e *Bacillus* sp. (UFLA 24).

Tabela 1: Bactérias endofíticas candidatas ao controle biológico da murcha bacteriana.

Isolados (bactérias endofíticas)	Hospedeiro	Origem (Isolado por/ Ano)
UFLA 07, 22, 24, 37, 40, 45 e 47.	<i>Solanum lycopersicum</i>	Campos Silva et al. (2008)
UFLA 02, 06, 12, 20, 39, 50 e 51.	<i>S. lycopersicum</i>	Campos Silva et al. (2008)
UFLA 285	<i>Gossypium hirsutum</i>	Medeiros, (2008).

Utilizou-se um isolado de *R. solanacearum* proveniente de material infectado do município de Carandaí – Minas Gerais. Durante os ensaios os isolados bacterianos foram preservados em tubo contendo meio 523 (KADO & HESKETT,1970) inclinado para o uso contínuo e em óleo mineral para estoque e preservação das características genéticas (LELLIOTT & STEAD, 1987; ROMEIRO, 2001).

2.2 Atividade antagonística *in vitro* de isolados endofíticos bacterianos à *Ralstonia solanacearum*

Os isolados das bactérias endofíticas foram avaliados quanto à redução do crescimento *in vitro* de *R. solanacearum*. Para isso, foi realizado o teste de antibiose, como proposto por Vidaver et al., (1972) (com modificações), através da dupla camada de meio de cultura, em placas de Petri.

Inicialmente, formou-se uma camada básica de 6 mL de meio de cultura sólido 523 nas placas de Petri. As bactérias endofíticas foram cultivadas em meio 523 líquido e mantidas sob agitação em Shaker durante 10 h, a 40 rpm e 28 °C e, posteriormente, repicadas em pontos equidistantes 0,5 µL das suspensões de cada isolado endofítico, juntamente com o tratamento controle (água destilada e esterilizada). As colônias foram incubadas nas placas por 12 h, a 28 °C para crescimento. Após a incubação e crescimento, as colônias foram mortas pela exposição a vapores de clorofórmio durante uma hora, seguidas de exposição direta à luz ultravioleta (UV) por mais uma hora.

Simultaneamente, *R. solanacearum* foi cultivada em meio 523 líquido, durante 24 h a 28 °C, com agitação em Shaker a 38 rpm. Posteriormente, adicionou-se 0,1 mL de cultura de *Rs* previamente cultivada em meio líquido a 5 mL de meio de cultura 523 semi-sólido fundente (45°C, contendo ágar 0,8%). Os tubos foram agitados suavemente com as mãos, para homogeneização e para se evitar a formação de bolhas de ar. O meio semi-sólido

contendo o patógeno foi então vertido sobre a camada básica contendo as colônias inativas e incubado a 28 °C, para avaliação da inibição ou não do crescimento de *R. solanacearum*.

O experimento constou de cinco repetições para cada isolado das bactérias endofíticas e controle, dispostos em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Os halos de inibição de crescimento foram mensurados em centímetros. Os dados foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

2.3 Atividade *in vivo* de isolados bacterianos endofíticos à *Ralstonia solanacearum*

2.3.1 Preparo das mudas de tomate em casa de vegetação

Sementes de tomate ‘Santa Clara’ foram desinfestadas superficialmente em álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio 2% (três minutos) e três lavagens em água destilada e esterilizada. Posteriormente, as sementes foram bacterizadas com suspensões de $\sim 10^8$ células mL⁻¹ ($OD_{540nm} = 0,5$) (PINHO et al., 2009) de cada isolado endofítico, por 24 h a 28 ± 5 °C. Para o preparo da suspensão adicionou-se solução salina 0,85% sobre as culturas bacterianas dos isolados endofíticos e foi feita a raspagem do crescimento bacteriano com alça de Drigalsky. As sementes desinfestadas foram colocadas em copos plásticos de 50 mL até ficarem imersas na suspensão bacteriana, e agitadas em Shaker a 38 rpm por 24 h. Para o tratamento controle, as sementes foram imersas em solução salina 0,85%. Depois de 24 h de bacterização das sementes, as mesmas foram semeadas em bandejas contendo substrato e areia, na proporção 1:1 (v:v) esterilizado em autoclave, e mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 25 ± 5 °C.

No período de 20 dias, as mudas de tomate foram transplantadas para vasos contendo a mistura de solo, areia e esterco (1:1:1) (v:v:v) não esterilizado.

O experimento foi conduzido em delineamento experimental de blocos casualizados (DBC), contendo três blocos e três repetições.

2.3.2 Métodos de inoculação de *Ralstonia solanacearum* em plantas de tomate

Inicialmente, preparou-se a suspensão de *Rs*, em solução salina 0,85% a partir de colônias cultivadas em meio 523 sobre placas de Petri por 48 h, em BOD a 28 ± 5 °C. Ao crescimento bacteriano foi adicionada solução salina 0,85% e feita à raspagem com alça de

Drigalski. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada em espectrofotômetro para $OD_{540nm} = 0,1$, equivalente a $\sim 10^8$ células (BARRETI et al, 2010). Dois métodos de inoculação da bactéria fitopatogênica foram testados.

2.3.3 Inoculação por imersão das raízes das mudas de tomate em suspensão de *Ralstonia solanacearum*

Após 20 dias da semeadura, as raízes das mudas foram submetidas à imersão por 5 minutos em suspensão bacteriana de *Rs*, na concentração $OD_{540nm}=0,1$ (BARRETI et al, 2010). Em seguida as mudas foram transplantadas para vasos de 1,5 L contendo a mistura de solo, areia e esterco (1:1:1) (v:v:v) não esterilizado.

O delineamento experimental foi de blocos casualizados (DBC) com três blocos e três repetições. Duas testemunhas foram preparadas, positiva, inoculada com a *Rs*, e negativa, não inoculada. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação sob temperatura de 25 ± 5 °C, até o final das avaliações.

2.3.4 Inoculação por irrigação do substrato com suspensão de *Ralstonia solanacearum*

Mudas, com duas folhas verdadeiras foram transplantadas para vasos contendo a mistura de solo, areia e esterco (1:1:1) (v:v:v) não esterilizado. Após o transplantio, as mudas foram irrigadas com 30 mL de suspensão bacteriana na concentração $OD_{540nm}=0,1$ (BARRETI et al., 2010).

O experimento constou de uma testemunha positiva, inoculada com a fitobactéria patogênica, e por uma testemunha negativa, a qual foi irrigada apenas com água. O delineamento experimental foi de blocos casualizados (DBC), com três blocos e três repetições. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação sob temperatura de 25 ± 5 °C.

2.3.5 Avaliação da severidade da murcha bacteriana

A avaliação da severidade da murcha bacteriana foi iniciada ao quinto dia após a inoculação com *Rs*, e manteve-se o intervalo de dois dias entre as avaliações, seguindo a escala descritiva proposta por Winstead & Kelman (1952), adaptada por Barretti et al. (2012) (Tabela 2). Após o término das avaliações, os dados de severidade foram integrados ao longo

do tempo, obtendo-se a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), pela fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=1}^{n-1} [(X_i + X_{i+1})/2](t_{i+1} - t_i) \text{ (Shaner \& Finney, 1977)}$$

em que X é a intensidade da doença, t o tempo e n o número de avaliações no tempo.

Os ensaios foram conduzidos em delineamento blocos casualizados (DBC). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente no *software* SISVAR (FERREIRA, 2011), as médias foram submetidas à análise de variância e, quando significativas, agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0.05$).

Tabela 2: Escala descritiva proposta por Winstead & Kelman (1952), para avaliação da severidade da murcha bacteriana.

Notas	Sintomas
1	Ausência de sintomas
2	Até 1/3 folhas murchas
3	1/3 a 2/3 folhas murchas
4	Todas as plantas murchas, exceto o broto terminal, que deve estar normal
5	Murcha irreversível ou planta morta

3 RESULTADOS

3.1 Atividade antagonística *in vitro* de isolados endofíticos bacterianos à *Ralstonia solanacearum*

Nove isolados bacterianos apresentaram antagonismo à *Ralstonia solanacearum* (Tabela 3). Desses, seis isolados, UFLA – 22, 285, 50, 51, 40 e 47, foram superiores em relação aos demais tratamentos e ao controle, apresentando halos de inibição com raios de 1,56, 1,44, 1,44, 1,24, 1,20, 1,10 cm, respectivamente.

Tabela 3: Atividade antagônica das bactérias endofíticas a *Ralstonia solanacearum*.

Isolados bacterianos endofíticos	Halo de inibição (raio em cm)
UFLA 22	1,56 a ¹
UFLA 285	1,44 a
UFLA 50	1,44 a
UFLA 51	1,24 a
UFLA 40	1,20 a
UFLA 47	1,10 a
UFLA 37	0,64 b
UFLA 39	0,54 b
UFLA 24	0,30 c
UFLA 02	0,00 c
UFLA 06	0,00 c
UFLA 07	0,00 c
UFLA 12	0,00 c
UFLA 20	0,00 c
UFLA 45	0,00 c
Testemunha	0,00 c

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna, não se agrupam pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

3.2 Atividade *in vivo* de isolados bacterianos endofíticos à *Ralstonia solanacearum*

Os dois métodos de inoculação da *R. solanacearum* foram eficazes em promover a penetração da bactéria fitopatogênica. As injúrias ocorridas nas raízes das mudas de tomate no momento do transplante produziram sintoma de murcha das plantas após a inoculação, os quais foram confirmados mediante a exsudação do pus bacteriano.

No método de imersão das raízes, houve diferença significativa em 13 tratamentos UFLA – 22, 37, 51, 02, 07, 45, 50, 12, 285, 24, 40, 39 e 06 (Tabela 4), em relação ao controle. Os isolados UFLA 20 e 47 não diferiram da testemunha na porcentagem de controle da murcha bacteriana.

Tabela 4: Avaliação da Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença, percentual de controle dos isolados endofíticos sobre a severidade da murcha bacteriana na inoculação por imersão das raízes, e avaliação da presença ou ausência do halo de inibição *in vitro* dos isolados endofíticos.

Isolados endofíticos	AACPD	% de Controle	Halo de inibição
UFLA 22	9,67 a ¹	66,66	+
UFLA 37	10,00 a	65,52	+
UFLA 51	13,33 a	54,03	+
UFLA 02	13,33 a	54,03	-

UFLA 07	13,67 a	52,86	-
UFLA 45	14,00 a	51,72	-
UFLA 50	14,00 a	51,72	+
UFLA 12	15,33 a	47,14	-
UFLA 285	15,67 a	45,97	+
UFLA 24	16,00 a	44,83	+
UFLA 40	16,67 a	42,52	+
UFLA 39	17,33 a	40,24	+
UFLA 06	18,67 a	35,62	-
UFLA 47	24,67 b	14,93	+
UFLA 20	25,33 b	12,66	-
Testemunha	29,00 b	0,00	-

(+): Presença de halo de inibição; (-): Ausência de halo de inibição

¹Médias seguidas por letras distintas na coluna não pertencem ao mesmo grupo no teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$)

Houve diferença significativa entre os tratamentos via irrigação do solo (Tabela 5), em sete tratamentos, sendo, UFLA – 06, 20, 02, 47, 50, 07 e 51, os mais eficazes. Os demais isolados foram agrupados com a testemunha (100% de doença).

Comparando-se os métodos de inoculação de *Rs*, a imersão de raízes foi mais severa, pois o tratamento controle produziu o maior valor de AACPD do que no tratamento via irrigação do solo (Tabelas 4 e 5).

Tabela 5: Avaliação da Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença, percentual de controle dos isolados endofíticos sobre a severidade da murcha bacteriana na inoculação via irrigação do solo, e avaliação da presença ou ausência do halo de inibição *in vitro* dos isolados endofíticos.

Isolados endofíticos	AACPD	% de Controle	Halo de inibição
UFLA 06	9,33 a ¹	65,02	-
UFLA 20	10,67 a	60,00	-
UFLA 02	10,67 a	60,00	-
UFLA 47	12,33 a	53,77	+
UFLA 50	13,33 a	50,02	+
UFLA 07	13,67 a	48,74	-
UFLA 51	16,00 a	40,00	+
UFLA 22	18,33 b	31,27	+
UFLA 40	20,33 b	23,77	+
UFLA 285	20,33 b	23,77	+
UFLA 39	21,00 b	21,26	+
UFLA 12	21,67 b	18,75	-
UFLA 24	22,33 b	16,27	+
UFLA 37	23,00 b	13,76	+
UFLA 45	26,33 b	1,27	-
Testemunha	26,67 b	0,00	-

(+): Presença de halo de inibição; (-): Ausência de halo de inibição

¹Médias seguidas por letras iguais na coluna pertencem ao mesmo grupo no teste de Scott Knott, ($p \leq 0,05$)

4 DISCUSSÃO

Nove isolados apresentaram halo de inibição *in vitro* ao crescimento de *R. solanacearum* com diferença na análise estatística ($p \leq 0,05$), demonstrando possivelmente possuírem o mecanismo de sintetizar compostos com ação antimicrobiana. O período de tempo para a produção desses compostos com ação bactericida pelas bactérias endofíticas foi suficiente, pois os halos de inibição demonstram que houve a produção de algum metabólito no meio de cultura. Em experimento realizado por Purnawati et al. (2014), ao analisarem dez isolados bacterianos endofíticos *in vitro* contra a *Rs*, verificaram que dois isolados, denominados de Ps1 e Ps8, apresentaram halo de inibição à *Rs* de 4 mm de ambos. Além disso, os autores observaram que o halo de inibição aumentou após 72 h da incubação, passando para 6 mm o Ps1 e 5 mm o Ps8. A partir do halo de inibição, os autores, evidenciaram o mecanismo da antibiose como bacteriostático. Da mesma maneira que foi observado por Almoneafy et al. (2012), que testaram dez isolados endofíticos no antagonismo à *Rs*, sendo que quatro isolados apresentaram os maiores halos de inibição, os quais denominados, Am1 (*Bacillus amyloliquefaciens*), D16 (*B. subtilis*), D29 (*B. amyloliquefaciens*) e H8 (*B. methylotrophicus*) com 9,33, 8,33, 9,33 e 8,66 mm de diâmetro, respectivamente. Em razão da presença do halo de inibição, sugere-se que o mecanismo de atuação desses isolados seja a produção de bacteriocinas, como por exemplo, as bacilicina, bacilomicina, fengicina, iturina, mersacidina, micosubilitina e surfactina (STEIN, 2005), possuindo um efeito direto sobre o crescimento do patógeno.

Tan et al. (2013), selecionaram dois isolados de *Bacillus amyloliquefaciens* para competir contra *Rs* na colonização de raízes de planta de tomate, e conseqüentemente, controlá-la. Os dois isolados apresentaram halo de inibição *in vitro* à *Rs*, e posteriormente foram testados em casa de vegetação. No teste *in vivo*, apresentaram redução da severidade da murcha bacteriana em 70,1% e 79,4%, em relação ao tratamento controle. Além disso, os isolados de *Bacillus* sp. tiveram reações positivas a amônia, produção de ácido indol acético e sideróforos e atividade solubilizante de fosfato, contribuindo para a promoção de crescimento das plantas de tomates.

No resultado do ensaio em casa de vegetação deve-se considerar a influência das condições ambientais para o desenvolvimento da doença, alta temperatura e alta umidade, assim como a interação patógeno-hospedeiro, para que haja uma resposta de defesa da planta. Almoneafy et al. (2012), encontraram redução da severidade da murcha bacteriana por

rizobactérias entre em 81,14% a 88,98% por *Bacillus subtilis*, *B. amyloquiefaciens* e *B. methylotrophicus*.

Conforme os dados apresentados nas tabelas 4 e 5, isolados que expressaram atividade antagônica *in vitro* não obrigatoriamente foram efetivos na redução da severidade da murcha bacteriana em casa de vegetação, o que mostra a interação do ambiente sobre o desenvolvimento da doença e os vários mecanismos de ação que as bactérias endofíticas podem agir sobre a *Rs*. Diante disso, os isolados bacterianos endofíticos que demonstraram valores de controle superiores em relação ao tratamento controle em casa de vegetação, provavelmente atuaram contra a *Rs*, com o mecanismo de ação de indução de resistência. Embora os mecanismos de atividade de biocontrole de *Bacillus* spp. se refiram preferencialmente a sua capacidade de produzir uma ampla gama de compostos antimicrobianos, há também a atuação como eliciadores da resistência sistêmica induzida de plantas (HASS & DEFAGO, 2005). Li et al. (2017), observaram que plantas de tomate tratadas com *B. myloliquefaciens* (isolado SQRT3) e inoculadas com *R. Solanacearum*, apresentaram aumento nas atividades de peroxidase e polifenoloxidase. A inoculação do isolado SQRT3 reduziu a peroxidação lipídica da membrana em folhas de tomate. Além do mais, as expressões de genes marcadores das vias de sinalização dependentes do ácido jasmônico e ácido salicílico foram mais rápidas e mais fortes em plantas de tomate tratadas com o isolado SQRT3 e *R. solanacearum* do que em plantas tratadas somente com *R. solanacearum* ou com isolado SQRT3.

Foi observado um retardo no surgimento do sintoma da murcha bacteriana nas plantas inoculadas com o isolado UFLA 06, via irrigação do solo, os quais só ocorreram nas folhas mais velhas a partir da terceira avaliação da severidade em casa de vegetação. Este fato está relacionado à menor AACPD que caracterizou esse isolado entre os mais eficientes no controle da severidade da doença. Relatado isso, pode ser uma característica de interesse para um agente de controle biológico, apresentar um retardo nos sintomas para que a produção ocorra sem ter perdas significativas pela doença bacteriana.

5 CONCLUSÃO

Seis isolados bacterianos, UFLA - 22, 285, 50, 51, 40 e 47, entre 15 testados, inibiram o crescimento *in vitro* de *Raltonia solanacearum*.

Sete isolados bacterianos, UFLA - 06, 20, 02, 47, 50, 07 e 51, entre 15 testados, apresentaram controle da murcha bacteriana em tomateiro em casa de vegetação.

Os isolados bacterianos UFLA - 47, 50 e 51 produziram halo de inibição do crescimento *in vitro* de *Raltonia solanacearum* e controle da murcha bacteriana do tomateiro em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

- ALMONEAFY, A. A.; XIE, G. L.; TIAN, W. X.; XU, L. H.; ZHANG, G. Q.; IBRAHIM, M. haracterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potential plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt. **African Journal of Biotechnology**, vol. 11, n. 28, p. 7193-7201, 2012.
- ALVARENGA, M. A. R. Tomate: produção em campo, em casa de vegetação e em hidroponia. **Editora UFLA**, 2004.
- BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A.; RESENDE, M. L. V. Aplicação e doses de acibenzolar-S-metil na proteção contra a murcha bacteriana, população do patógeno e crescimento do tomateiro. **Tropical Plant Pathology**, vol. 35, n. 4, 229-235, 2010.
- BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A.; SOUZA, J. T. Combination of endophytic bacteria and resistant cultivars improves control of *Ralstonia* wilt of tomato. *Australasian Plant Pathol*, v. 41, p. 189–195, 2012.
- CAMPOS-SILVA, J. R. *et al.* Control with endophytic bacteria and *in vitro* inhibition of *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, agent of bacterial speck of tomato. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, jul./ago. 2008.
- CIAMPI-PANNO, L.; FERNANDEZ, C.; BUSTAMENTE, P.; ANDRADE N.; OJEDA, S.; CONTREAS, A. Biological Control of Bacterial Wilt of Potatoes Caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Am. Potato J.**, v. 66, n. 5, p. 315-332. 1989.
- COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENTE, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: *principles, mechanisms of action, and future prospects*. **Appl Environ Microbiol** 71: 4951–4959. 2005.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.1039-1042, 2011.
- FRANCIS, I.; HOLSTERS, M.; VEREECKE, D. The Gram-positive side of plant–microbe interactions. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2010.
- FRENCH, E. R.; SEQUEIRA, L. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central America and South America a Comparative Study. *Phytopathology*, v. 60, n. 3, p. 506-&. 1970.
- HAAS, D.; DEGAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. **Nat Rev Micro**, v. 3, n. 4, p. 307-319, 2005.
- HAYWARD, A. C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 29, p. 65-87, 1991. HAYWARD, A. C. *Ralstonia solanacearum*. **In Encyclopedia of Microbiology**, 2nd edn, pp. 32–42. Edited by J. Lederberg, M. Alexander & B. R. Bloom. San Diego: Academic Press. 2000.

KADO, C.I. E HESKETT, M.G. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969. 1970.

KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. A literature review and bibliography. **North Carolina Agricultural Experiment Station Technical Bulletin**, vol. 99. Raleigh, NC: North Carolina Agricultural Experiment Station. 1953.

LELLIOTT, R. A. A.; STEAD, D. E. **Methods for the Diagnosis of Bacterial Plant Disease** 216.1987.

LI, C.; HU, W.; PAN, B.; LIU, Y.; YUAN, S.; DING, Y.; LI, R.; ZHENG, X.; SHEN, B.; SHEN, Q. Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SQRT3-Mediated Induced Systemic Resistance Controls Bacterial Wilt of Tomato. **Pedosphere**, v. 27, n. 6, p. 1135-1146, 2017.

MEDEIROS, F. H.; SOUZA, R. M.; FERRO, H. M.; MEDEIROS, F. C.; POMELLA, A. W.; MACHADO, J. C.; SANTOS NETO, H.; SOARES, D. A.; ZANOTTO, E.; PARÉ, P. W. *Bacillus* spp. to manage seed-born *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* damping off. **Phytopathology**. 2008.

PINHO, R. S. C.; CAMPOS, V. P.; SOUZA, R. M.; SILVA, J. R.C.; OLIVEIRA, M. S.; PIMENTEL, G. C. S.; COSTA, L. S.A.S. Efeito de Bactérias Endofíticas no Controle de *Meloidogyne incognita* e sua Capacidade de Colonização de Raízes de Tomateiro. **Nematologia Brasileira Piracicaba** (SP) Brasil, Vol. 33, 2009.

PURNAWATI, A.; SASTRAHIDAYAT, I. R.; ABADI, A. L.; HADIASTONO, T. Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt Disease. **The Journal of Tropical Life Science**, v. 4, n. 1, p. 33-36, 2014.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. 1st ed. 279. 2001.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, St Paul, v. 70, p. 1183-1186, 1977.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 56, n. 4, p. 845-857, 2005.

TAN, S.; JIANG, Y.; SONG, S.; HUANG, J.; LING, N.; XU, Y.; SHEN, Q. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. **Crop Protection**, v. 43, p. 134-140, 2013a.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annu. Rev. Phytopathol.** 36:453-483. 1998.

VIDAVER, A. K., *et al.* Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology**, v, 18, p.705-13, 1972.

WINSTEAD, N. N.; KELMAN, A. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. **Phytopathology**, v. 42, p. 628-634, 1952.